



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Tin Tomaš

**UPOTREBLJIVOST GENA ZA RIBOSOMSKU RNA I
GENA KOJI KODIRAJU PROTEINE
U REKONSTRUKCIJI FILOGENETSKIH ODNOSA
UNUTAR PORODICE ELMIDAE (COLEOPTERA)**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistra kemije

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za evolucijsku genetiku Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod mentorstvom i neposrednim vodiojstvom dr.sc. Branke Bruvo Mađarić. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc.dr.sc Marko Močibob.

Zahvale

Za početak, zahvaljujem mojoj mentorici dr. sc. Branki Bruvo Mađarić na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju i vremenu koje mi je posvetila. Njena podrška i strpljenje pomogli su da ustrajem.

Hvala doc. dr. sc. Marku Močibobu što je bio nastavnik ovog diplomskog rada. Njegovi savjeti i komentari bili su uvijek dragocjeni.

Posebno hvala svim djelatnicima na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta koji su me podučavali i prenosili svoja znanja i vještine. Za mene je bila velika čast i privilegija biti njihov student.

Na kraju, najviše hvala mojoj obitelji, posebice mojoj majci koja nepokolebljivo vjeruje u mene.

Sadržaj

SAŽETAK.....	II
ABSTRACT	III
1. UVOD	XIII
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Molekularna filogenetika	2
2.1.1. <i>Filogenetska stabla</i>	4
2.1.2. <i>Molekularni markeri u filogenetskim istraživanjima</i>	8
2.1.2.1. <i>Mitohondrijska DNA u filogenetskim istraživanjima</i>	9
2.1.2.2. <i>Nuklearna DNA</i>	14
2.1.3. <i>Računalne metode u filogenetici</i>	14
2.2. Kornjaši (Coleoptera).....	17
2.2.1. <i>Vodeni kornjaši</i>	18
2.2.1. <i>Porodica Elmidae</i>	19
3. MATERIJALI I METODE.....	20
3.1. Materijali	20
3.1.1. <i>Životinjski materijali</i>	20
3.1.2. <i>Kemikalije upotrijebljene u molekularnim istraživanjima</i>	21
3.1.3. <i>Kompleti reagensa upotrijebljeni u molekularnim analizama</i>	22
3.1.4. <i>Uređaji</i>	22
3.2. Metode	23
3.2.1. <i>Izolacija genomske DNA</i>	23
3.2.2. <i>Lančana reakcija polimerazom</i>	23
3.2.3. <i>Razdavanje fragmenata DNA u gelu agaroze</i>	24
3.2.4. <i>Pročišćavanje PCR produkata</i>	24
3.2.4.1. <i>Pročišćavanje fragmenata enzimatskom reakcijom</i>	24
3.2.4.2. <i>Pročišćavanje fragmenata DNA iz gela agaroze</i>	24
3.2.5. <i>Određivanje nukleotidnog slijeda PCR produkata</i>	25
3.2.6. <i>Bioinformatička analiza</i>	25
3.2.6.1. <i>Višestruko stvarnjivanje nukleotidnih slijedova</i>	28
3.2.6.2. <i>Filogenetske analize nukleotidnih slijedova</i>	28
4. REZULTATI	30

4.1. Lančana reakcija polimeraze (PCR).....	30
4.2. BLAST analize	38
4.3. Poravnanje nukleotidnih slijedova	38
4.4. Filogenetske analize	39
4.4.1. Srodstvene analize gena za <i>COI</i>	39
4.4.2. Srodstvene analize gena za <i>12S rRNA</i>	42
4.4.3. Srodstvene analize ulančanih mitohondrijskih gena (<i>COI</i> i <i>12S rRNA</i>).....	20
4.4.4. Srodstvene analize gena za <i>ArgK</i>	46
4.4.5. Srodstvene analize gena za <i>CAD</i>	48
4.4.6. Srodstvene analize gena za <i>18S rRNA</i>	51
4.4.7. Srodstvene analize gena za <i>28S rRNA</i>	53
4.4.8. Srodstvene analize ulančanih nuklearnih gena (<i>ArgK</i> , <i>CAD</i> , <i>18S rRNA</i> i <i>28S rRNA</i>).....	55
4.4.9. Srodstvene analize protein kodirajućih gena (<i>ArgK</i> , <i>COI</i> i <i>CAD</i>)	57
4.4.10. Srodstvene analize ulančanih ribosomskih gena (<i>12SrRNA</i> , <i>18S rRNA</i> i <i>28S rRNA</i>).....	59
4.4.11 Analize svih analiziranih ulančanih gena.....	61
5. RASPRAVA	63
6. ZAKLJUČAK	68
7. LITERATURNI IZVORI.....	69
8. PRILOZI.....	IV
9. ŽIVOTOPIS	V



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Upotrebljivost gena za ribosomsku RNA i gena koji kodiraju proteine u rekonstrukciji filogenetskih odnosa unutar porodice Elmidae (Coleoptera)

Tin Tomaš

Laboratorij za evolucijsku genetiku,
Zavod za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Hrvatska
Zavod za biokemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu,
Horvatovac 102A, 10000 Zagreb, Hrvatska

Elmidae (Coleoptera) je porodica vodenih kornjaša koji se često koriste kao bioindikatori u tekućicama, no filogenetski odnosi unutar porodice su dosada slabo istraženi. U ovom radu analizirana je upotrebljivost gena za ribosomsku RNA i odabranih gena koji kodiraju proteine za pouzdanu rekonstrukciju filogenetskih odnosa vrsta, rodova i podporodica unutar porodice Elmidae. Filogenetske analize pokazale su da su geni za COI i 12S rRNA vrlo varijabilni, a gen za 18S rRNA je izuzetno konzerviran te ovi markeri ne daju pouzdane rezultate. Nuklearni geni za 28S rRNA, CAD i Arg daju bolje razlučivanje i podršku za topologiju. Kombiniranjem većeg broja markera postignuti su znatno bolji rezultati, posebice kombinacijom nuklearnih gena. U većini analiza podporodice Elminae i Larinae su međusobno parafiletske, te ovo istraživanje upućuje na potrebu revizije taksonomskog statusa skupina unutar porodice Elmidae.

(72 stranica, 49 slika, 43 tablice, 80 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: Elmidae, Coleoptera, molekularna filogenetika, molekularni markeri,

Mentor: Dr. sc. Branka Bruvo Mađarić

Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka: Doc. dr. sc. Marko Močibob

Ocjenitelji:

1. Doc. dr. sc. Marko Močibob
2. Izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
3. Prof. dr. sc. Tomica Hrenar

Zamjena: Doc. dr. sc. Ivan Kodrin

Datum diplomskog ispita: 28. rujan 2017.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Phylogenetic utility of ribosomal and protein-coding genes for reconstructing the phylogeny of Elmidae (Coleoptera)

Tin Tomaš

Laboratory for Evolutionary Genetics, Division of Molecular Biology, Ruđer Bošković Institute
Division of Biochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb

Elmidae (Coleoptera) is a family of water beetles which are often used as bioindicators in running waters. The phylogenetic relationships within the family are not very well studied. In this study we analysed the usefulness of ribosomal RNA coding genes and protein coding genes in the reconstruction of phylogenetic relationships within Elmidae. Phylogenetic analyses of COI and 12S rRNA genes have shown that these genes have too much variability, while the gene for 18S rRNA is too conserved to give reliable results. Nuclear genes for 28S rRNA, CAD and ArgK give substantially better results. The best results were obtained by combining different genes, especially nuclear genes. In most analyses subfamilies Elminae and Larinae are shown to be paraphyletic. This study shows the need for revising the taxonomic status of taxa within the family Elmidae.

(72 pages, 49 pictures, 43 tables, 80 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102A, 10 000 Zagreb, Croatia

Keywords: Elmidae, Coleoptera, molecular phylogenetics, molecular markers

Mentor: Dr.sc. Branka Bruvo Mađarić Research Associate

Supervisor: Dr.sc Marko Močibob., Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr.sc Marko. Močibib., Assistant Professor
 2. Dr.sc. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor
 3. Dr.sc. Tomica Hrenar, Professor
- Substitute: Dr.sc. Ivan Kodrin, Assistant Professor

Date of exam: 28. 09. 2017.

1. UVOD

Pripadnici porodice Elmidae nastanjuju sve kontinente. Do sada je opisano oko 1330 vrsta raspoređenih u 146 rodova. U Europi je opisano 11 rodova s oko 50-tak vrsta. Procjenjuje se da je dosada otkriveno samo 70 % postojećih vrsta i predviđa se da će konačan broj vrsta iznositi 1850. Ova porodica je slabo proučena, a na temelju standardnih morfoloških značajki nemoguće je razlikovati i odrediti pojedine vrste pa se smatra da unutar ove porodice postoje mnoge kriptične vrste. Za sada ih se dijeli u dvije podporodice: Larinae (26 rodova, 130 vrsta) i Elminae (120 rodova, 1200 vrsta), no upitan je monofiletski status ovih podporodica. Najveća raznolikost vrsta porodice Elmidae zabilježena je u planinskim područjima tropskih i suptropskih kišnih šuma jugoistočne Azije, pri čemu se ističe otok Borneo.¹ Tropska područja Afrike i Južne Amerike kao i Sjeverna Amerika još uvijek su područja relativno slabe istraženosti. Čini se da je zapadni dio ekološke regije Palearktika (unutar koje spada i područje Balkana i Hrvatske) bogat kompleks vrstama zbog čega će buduća istraživanja na ovom području zasigurno doprinijeti taksonomskim revizijama unutar ove porodice.¹

Do sada je provedeno vrlo malo istraživanja filogenetskih odnosa ove porodice² te postoji potreba za razjašnjenjem statusa dviju podporodica i odnosa između i unutar rodova, kao i taksonomskih statusa brojnih kriptičnih vrsta.

Svrha ovog rada je pridonijeti boljem razjašnjavanju statusa podporodica te odnosa između i unutar rodova. Korištenjem više različitih vrsta gena te njihovom kombinacijom nastojalo se odrediti najoptimalnije gene za pojedine vrste analiza te poboljšati metodologiju i odrediti optimalne parametre za njihovu analizu.

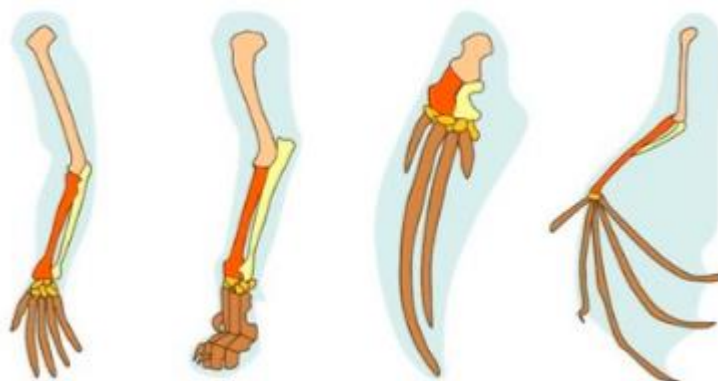
2. LITERATURNI PREGLED

2.1 Molekularna filogenetika

Filogenetika proučava evolucijsku povijest i odnose među skupinama organizama (npr: vrstama ili populacijama). Ti odnosi se rekonstruiraju metodama filogenetske inferencije kojima se promatraju opažene nasliedne osobine poput slijedova DNA ili morfologije, po modelu evolucije tih karakteristika. Filogenetska istraživanja omogućuju razumijevanje bioraznolikosti, evolucije, ekologije i genoma.³

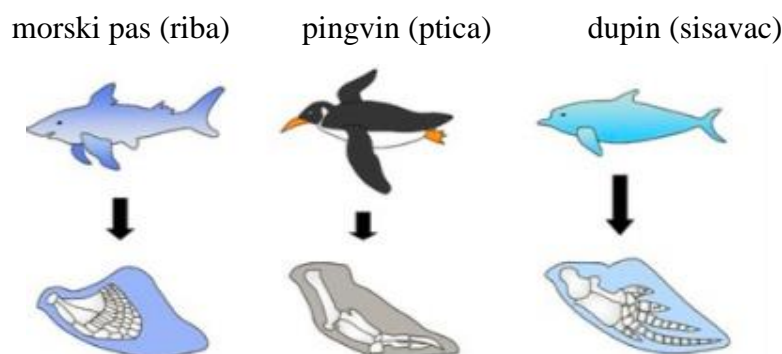
Tradicionalna filogenetika temelji se na morfološkim obilježjima dobivenim opažanjima i kvantificiranjem fenotipskih obilježja reprezentativnih organizama.⁴ U moderno vrijeme, filogenetske molekularne metode sve više koriste nukleotidne sekvence koje kodiraju gene ili aminokiseline kao bazu za klasifikaciju. Da bi se morfološka ili molekularna obilježja mogla koristiti u istraživanjima moraju imati svojstvo homologije.⁵

Homologija između parova struktura ili gena u različitim taksonima podrazumijeva njihovo porijeklo od zajedničkog pretka. Evolucijska biologija objašnjava homologne strukture koje su prilagođene različitim svrhama kao rezultat prilagodbe na različite životne uvjete.⁵ Prikladan primjer homologne strukture je zapešće kralježnjaka, gdje su krila šišmiša, ruke primata, prednje peraje kitova, prednje noge pasa i konja sve izvedene iz zajedničkog pretka tetrapodne strukture, a tijekom evolucije su se prilagodile različitim načinima kretanja pojedinih organizama. Primjeri homolognih organa prikazani su na slici 1.



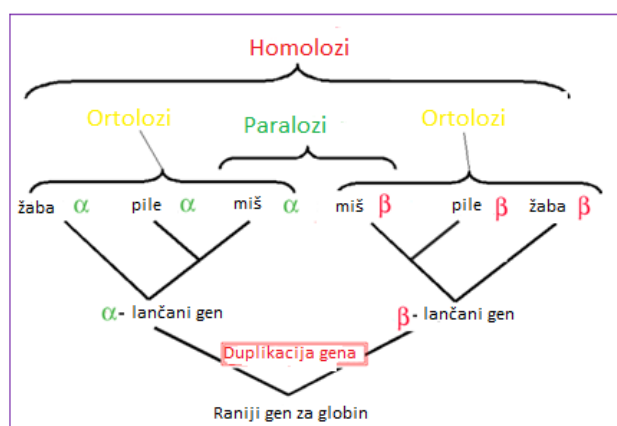
Slika 1. Homologne strukture (udovi). S lijeva na desno prikazane su: ruka primata, noga mačke, peraja kita, krilo šišmiša.⁶

Suprotna od homologije je homoplazija (analogija). To su analogni organi koji imaju istu funkciju u različitim organizmima no nisu bili prisutni u njihovom posljednjem zajedničkom pretku.⁷ Primjer takvih organa su krila kukaca i krila ptica koji su evoluirali neovisno, u različitim odvojenim grupama te su konvergirali zbog funkcionalnosti da bi omogućili letenje. Takvi se primjeri organa nazivaju analognim. Primjeri analognih organa prikazani su na slici 2.



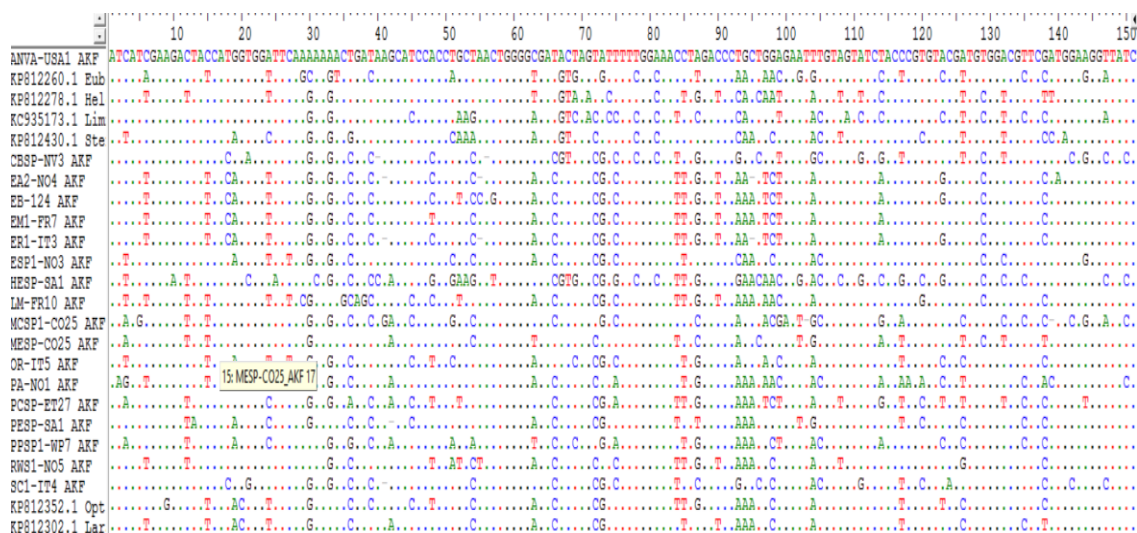
Slika 2. Prikaz analognih organa. Sve ove strukture imaju sličnu funkciju, ali nisu nastale iz istog pretka.⁶

Homologija između sekvenci proteina ili DNA podrazumijeva zajedničko porijeklo zbog specijacijskog događaja (ortologija) ili duplikacijskog događaja (paralogija) (slika 3). Samo ortološki geni se mogu koristiti u filogenetskim analizama.⁸



Slika 3. Primjer paralogije-ortologije kod gena za alfa i beta globin

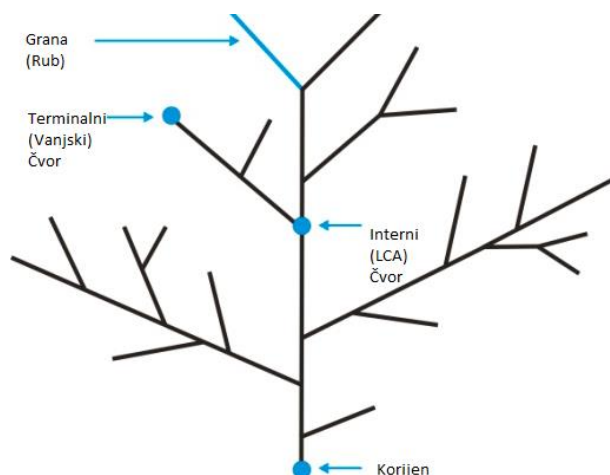
Homologija među proteinima i DNA se procjenjuje na temelju sličnosti njihovih sekvenci. Jako preklapanje sekvenci upućuje na to da su takve dvije sekvence povezane divergentnom evolucijom iz zajedničkog pretka. Poravnanja više sekvenci se koriste da bi se otkrile homologne regije.



Slika 4: Primjer prvih 150 parova baza poravnanih sekvenci za gen koji kodira arginin kinazu dobivenih korištenjem programa Clustal u BioEditu. Promjene u odnosu na prvi uzorak su prikazane slovima, a sačuvana mjesta su prikazana točkama.

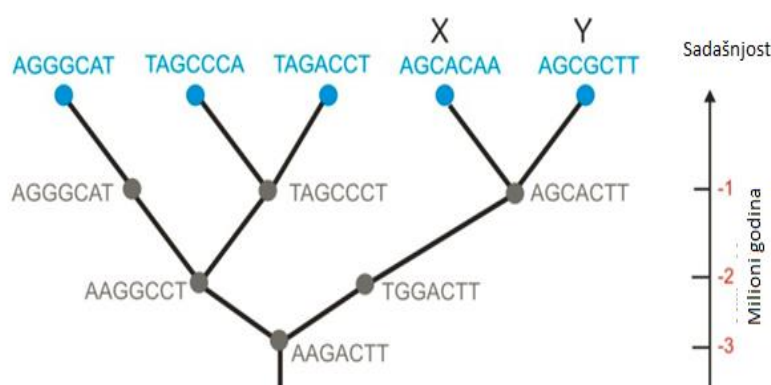
2.1.1. Filogenetska stabla

Rezultati filogenetskih analiza prikazuju se u obliku takozvanog filogenetskog stabla. Filogenetsko ili evolucijsko stablo je dijagramski prikaz hipoteze o povijesti evolucijskih poveznica grupa organizama. Vrhovi filogenetskog stabla mogu biti živi organizmi ili fosili. Oni predstavljaju terminalne taksone tj. sadašnjost u evolucijskoj liniji dok unutarnja grananja (čvorovi) predstavljaju njihove pretke, a "korijen" stabla je predak svih organizama uključenih u analizu.⁹ Primjer filogenetskog stabla prikazan je na slici 5.



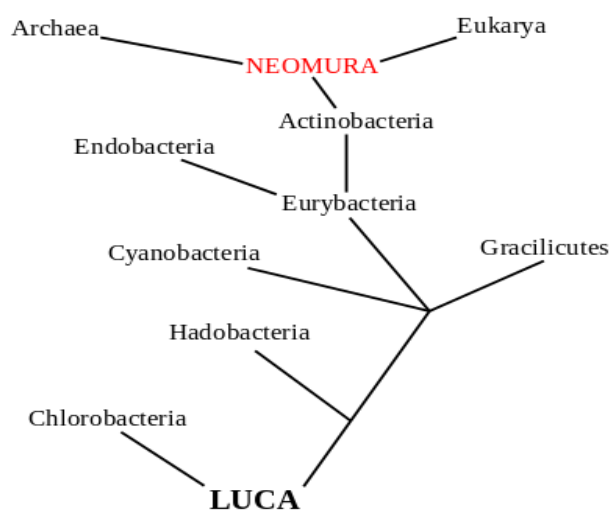
Slika 5. Filogenetsko stablo s označenim bitnim karakteristikama

Konstruiranje filogenetskog stabla zahtijeva homologiju karakteristika koje dijele taksoni koji se uspoređuju. U morfološkim studijama, to zahtijeva eksplicitne odluke o određivanju parametara i načinima na koji će se ti parametri mjeriti, dok je kod molekularnih studija primarni problem u stvaranju poravnanih slijedova (eng. *Multiple sequence alignment* (MSA)) između gena ili sekvenca aminokiselina.⁹ Filogenetska stabla koja su konstruirana računalnim metodama ne predstavljaju stvarnu sliku povijesti veza između vrsta koje su analizirane, već predstavljaju hipotezu o evolucijskim odnosima temeljenu na analizi pojedinog filogenetskog markera ili kombinacije više filogenetskih markera. Na slici 6. prikazan je primjer filogenetskog stabla konstruiranog na temelju nukleotidnih slijedova DNA.



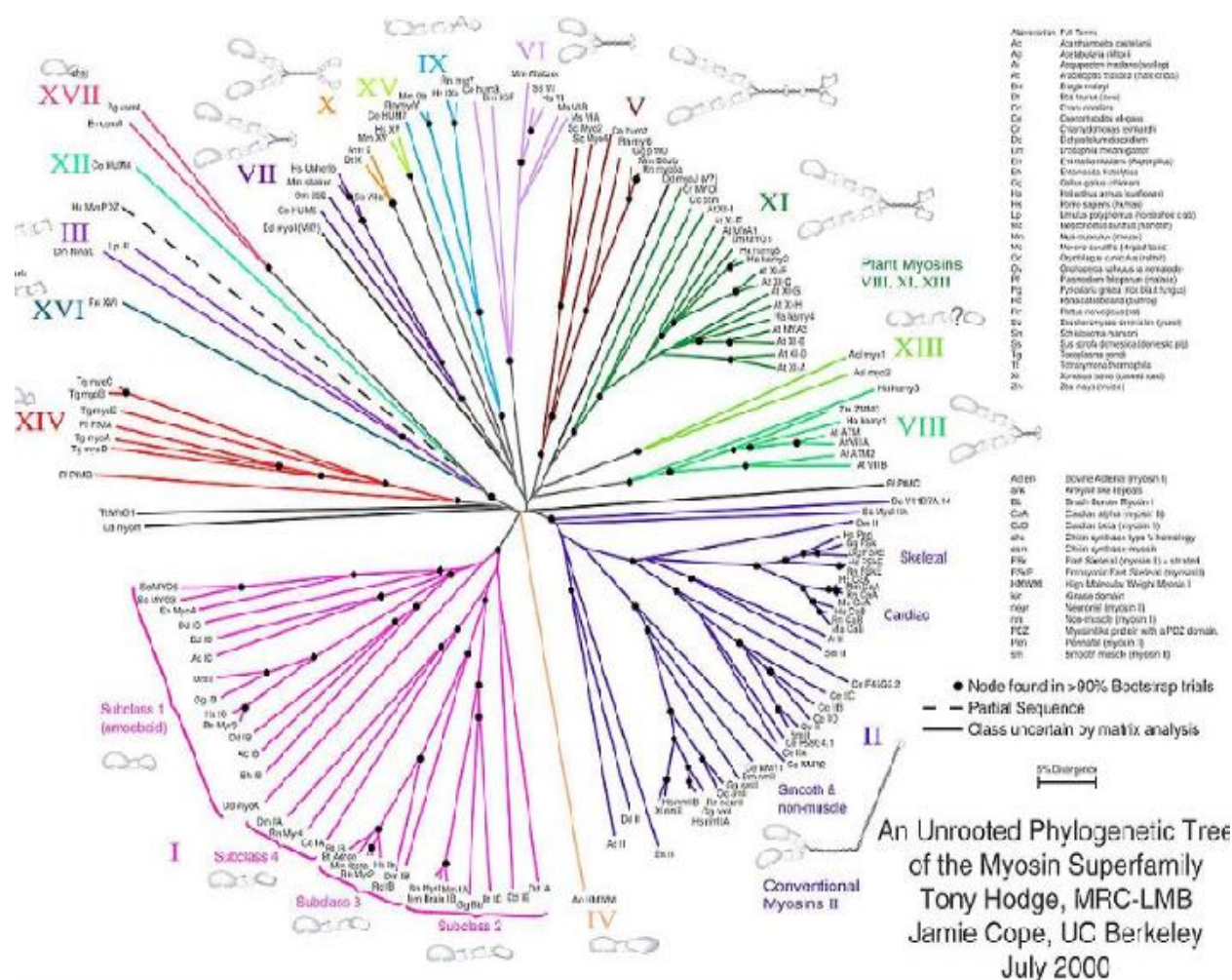
Slika 6. Filogenetsko stablo evolucije DNA sekvence

Filogenetska stabla mogu biti ukorijenjena ili neukorijenjena. U ukorijenjenom filogenetskom stablu, svako grananje s precima predstavlja pretpostavljenog najbližeg pretka te duljine grana kod nekih stabala predstavljaju procjenu godina divergencije. Svako grananje sa naziva taksonomskom jedinicom. Interna grananja se općenito nazivaju hipotetskim taksonomskim jedinicama, zato što ne mogu biti direktno uočena. Stabla su korisna u područjima biologije poput bioinformatike, sistematike i filogenetskih komparativnih metoda.⁹ Primjer ukorijenjenog filogenetskog stabla se može vidjeti na slici 7.



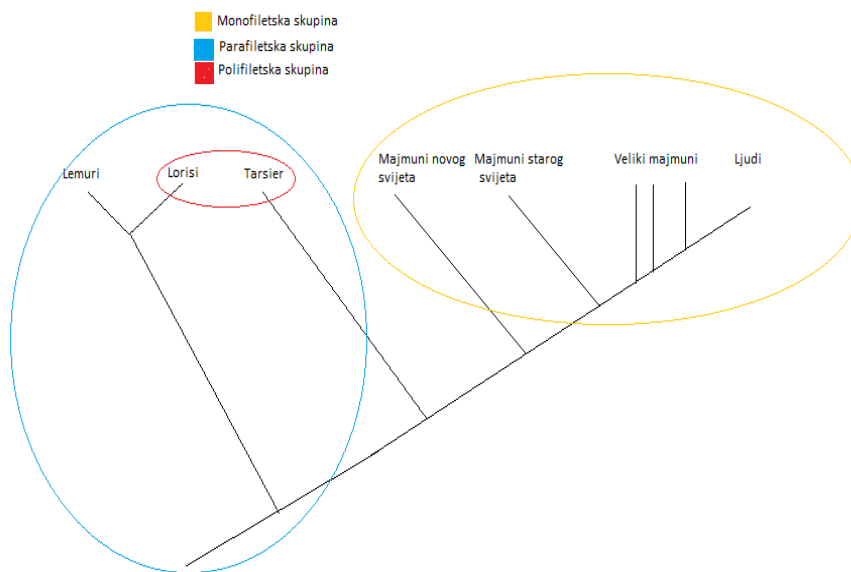
Slika 7. Primjer ukorijenjenog filogenetskog stabla koji pokazuje kako su eukarioti i arheje u bližem srodstvu od bakterija (temeljeno na Cavalier-Smith's teoriji bakterijske evolucije). Neomura je skupina koja se sastoji od dvije domene života, Archaea i Eukaryota. LUCA je kratica za zadnjeg poznatog pretka (engl. last universal common ancestor) svih organizama.¹¹

Neukorijenjena stabla prikazuju svezu grananja i ne zahtijevaju pretpostavljanje i poznavanje zajedničkog pretka.¹⁰ Primjer neukorijenjenog stabla se može vidjeti na slici 8.



Slika 8. Primjer neukorijenjenog filogenetskog stabla nadporodice miozina¹²

U taksonomiji postoji podjela na 3 različite grupe: monofiletske, parafiletske i polifiletske. Monofiletske grupe su taksoni (grupe organizama) koji se sastoje od svih potomaka zadnjeg zajedničkog pretka. Parafiletske grupe uključuju potomke zajedničkog pretka isključujući tipično jednu ili dvije monofiletske podgrupe. Polifiletske grupe su karakterizirane jednim ili više tipova homoplazije tj. fenotipova koji su konvergirali ili revertirali tako da izgledaju isto, ali nisu naslijeđeni, pa uključuju i pojedine taksone koji ne potječu direktno od zadnjeg zajedničkog pretka.¹³ Primjer monofilnosti, parafilnosti i polifilnosti prikazan je na slici 9.



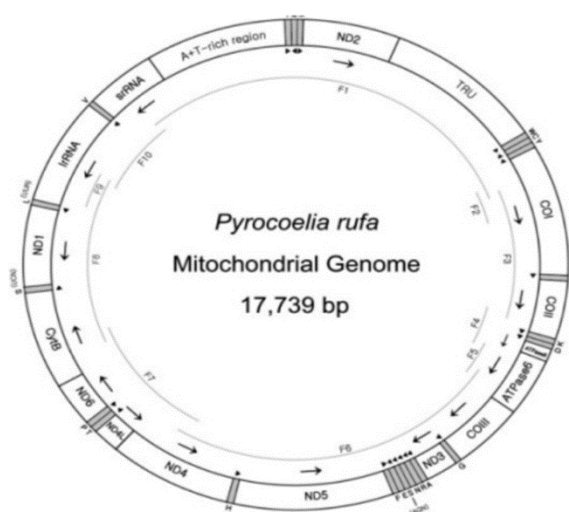
Slika 9. Skica filogenetskog stabla primata sa obojanim primjerima za monofilnost, parafilnost i polifilnost. Žuto je označena monofiletska skupina, plavo je označena parafiletska skupina, a crveno je označena polifiletska skupina.

2.1.2. Molekularni markeri u filogenetskim istraživanjima

Molekularni markeri su specifične molekule koje su sadržane u uzorku uzetom iz organizma (biološki markeri) i koriste se pri otkrivanju pojedinih karakteristika izvora uzorka te pri identifikaciji izvora. Postoje mnogi tipovi molekularnih markera te oni mogu biti organske (većinom biološke) ili anorganske molekule. Ovisno o svojstvima molekula i svojstvima izvora mogu imati različite primjene. Primjer često korištenog biološkog markera je molekula DNA koja sadrži informacije o genetskim poremećajima, genealogiji i evolucijskoj povijesti života. Specifične regije DNA (genetički markeri) koriste se za dijagnozu autosomálnih poremećaja recesivnih gena, taksonomska istraživanja, filogenetska istraživanja te pri identificiranju vrsta (DNA barkodiranje). Korištenjem molekularnih bioloških markera poput mitohondrijske ili nuklearne DNA i/ili proteina moguće je napraviti filogenetsku analizu. Razvitak metode lančane reakcije polimerazom (PCR) omogućio je puno iskorištavanje potencijala mitohondrijske i nuklearne DNA kao molekularnog markera za evolucijska i biološka istraživanja. Do danas je objavljen veliki broj univerzalnih i specifičnih početnica koje omogućuju umnažanje različitih dijelova genoma za filogenetska istraživanja u velikom broju skupina eukariotskih organizama. U filogenetskim istraživanjima koriste se npr. geni koji kodiraju za proteine kao i geni za ribosomske RNA.⁵

2.1.2.1. Mitohondrijska DNA

Vrlo često korišteni molekularni biološki markeri su mitohondrijski geni. Mitohondrijska DNA (mtDNA) je kružna dvolančana molekula veličine od 15-20 tisuća parova baza, te se nalazi unutar mitohondrija. Primjer molekule mtDNA se može vidjeti na slici 10. Ona se sastoji od nekodirajuće kontrolne regije (D-petlja) koja sadrži ponavljajuće dijelove te kodirajućeg dijela u kojem se nalazi 37 gena različitih funkcija i brzine evoluiranja, od čega su 22 gena za tRNA (transfer RNA), 2 gena za rRNA (ribosomsku RNA) i 13 gena koji kodiraju proteine uključene u transport elektrona za oksidativnu fosforilaciju.¹⁴



Slika 10. Mapa mitohondrijskog genoma vrste *Pyrocoelia rufa*.¹⁵

Krajem 1970-ih primijećena je važnost mtDNA kao dobrog molekularnog markera. Za filogenetska istraživanja često su korišteni geni za citokrom oksidazu (COI, COII i COIII) te geni za ribosomske DNA poput gena za 12S rRNA i 16S rRNA. Osim njih često se koriste i geni za Cytb, NADH te kontrolna regija (tzv. *D-loop*).¹⁶

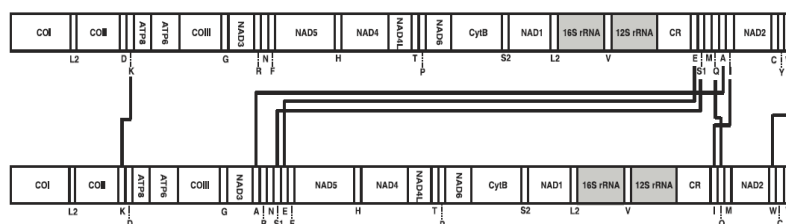
MtDNA ima mnoge karakteristike koje ju čine dobrim kandidatom za filogenetska istraživanja. Ona je mala kružna molekula jednostavne strukture i organizacije te je prisutna u svim stanicama u velikom broju kopija što omogućuje njezinu jednostavnu izolaciju. Pojava haploidije, nasljeđivanja po majci, neposjedovanje rekombinacije kao ni introna i ostalih nekodirajućih slijedova također olakšavaju molekularni pristup u analizama u kojima se mtDNA koristi kao marker.

Pojava nukleotidnih supstitucija češća je u mtDNA nego u jezgrinoj DNA. MtDNA ne kodira proteine koji su direktno uključeni u njezinu replikaciju, transkripciju ili translaciju što

uzrokuje brzu evoluciju mtDNA. MtDNA također ne posjeduje gene koji kodiraju enzime s lektorirajućom aktivnošću koji su važni za pravilno umetanje nukleotida tijekom DNA replikacije, odnosno popravak nakon oštećenja, što kumulativno povećava broj mutacija. Posebno treba naglasiti da je mtDNA mozaična tj. posjeduje regije sa različitom brzinom stope evolucije što omogućuje dizajniranje više ili manje konzerviranih početnica. To svojstvo omogućuje filogenetske analize na raznim taksonomskim razinama.¹⁶ Zbog tih svojstava pokazano je da je mtDNA vrlo moćno oruđe u intraspecijskim analizama vezanim uz geografske varijacije populacijske strukture i zoogeografiju.¹⁷

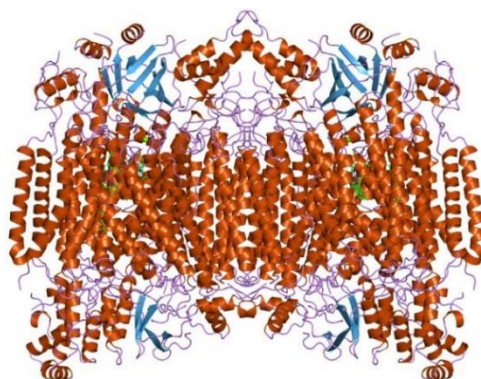
Nedostaci korištenja mtDNA u evolucijskoj biologiji su: heteroplazmija, slučajevi biparentalnog nasljeđivanja, neujednačeni molekularni sat, te postojanje paralognih kopija mtDNA u genomu jezgre (tzv. Numt-ova).¹⁶ Heteroplazmija je naziv za prisutnost više od jednog tipa genoma u organelima (mitohondrijski ili plastidni DNA). Biparentalno nasljeđivanje je tip međustaničnog nasljeđivanja u kojemu su stanice naslijedile organele od oba roditelja. NUMT (engl. "new might") je akronim za nuklearni mitohondrijski DNA segment. On opisuje transpoziciju bilo kojeg tipa DNA citoplazmatskih mitohondrija u nuklearnom genomu eukariotskih organizama.¹⁸ Sve više NUMT sekvenci različitih veličina i duljina je detektirano u raznim eukariotima, a gotovo sve regije mitohondrijskih genoma se mogu integrirati u nuklearni genom. NUMTovi variraju u brojevima i veličini ovisno o vrsti. Nakon što je mtDNA otpuštena u citoplazmu te prenesena u jezgru, eventualno se ugrađuje u nuklearnu DNA pri popravljaju dvostrukih prijeloma. Ovisno o mjestu umetanja NUMT pseudo gena može se dogoditi izmjena funkcije gena.¹⁸ Tijekom evolucije NUMT sekvence se mijenjaju različitom brzinom od originalnih mitohondrijskih gena, pa, ukoliko ne budu uočene, mogu uzrokovati netočnu filogenetsku interpretaciju.

Od mitohondrijskih gena koji se još koriste za filogenetska istraživanja najvažniji su ribosomski geni za 12S rRNA, 16S rRNA koji kodiraju gene za podjedinice mitohondrijskog ribosoma (slika 11).



Slika 11. Položaj rRNA gena (osjenčano) u mitohondrijskom genomu pčele i genomu artropodnog pretka. Razlike između genoma su prikazane ravnim linijama.¹⁹

Citokrom oksidazna podjedinica I (COI) je protein koji je biokemijski jako dobro istražen, a njegova veličina i struktura dobro su očuvane kod svih aerobnih organizama. Posjeduje važnu ulogu u procesu oksidativne fosforilacije te tako sudjeluje u transportu elektrona i protona na unutarnjoj membrani mitohondrija.²⁰ Struktura COI podjedinice se može vidjeti na slici 12.

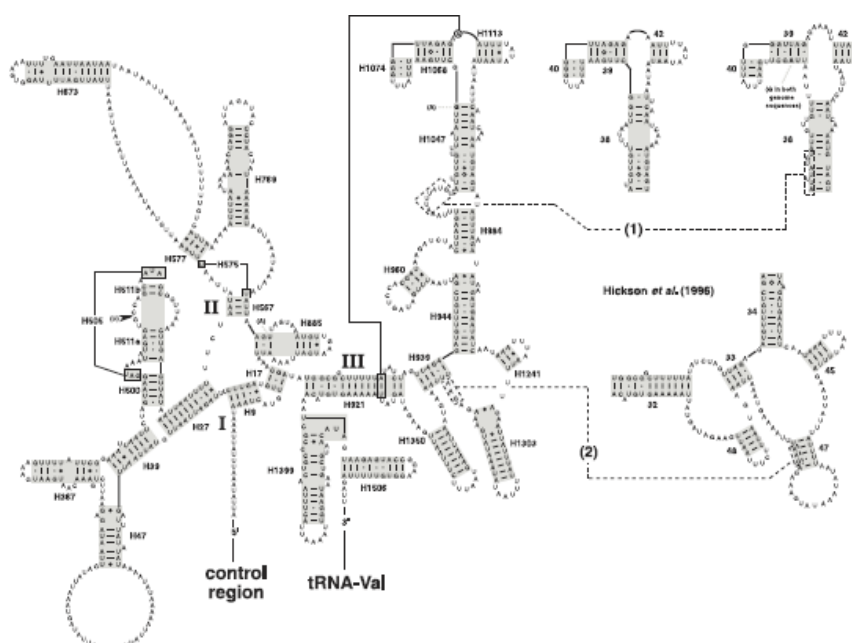


Slika 12. Kvaterna struktura COI podjedinice²¹

Posjeduje nekoliko tipova funkcionalnih domena unutar kojih se nalaze dobro očuvane aminokiseline čija je brzina supstitucije jako mala, što u svjetlu filogenetskih istraživanja omogućuje rješavanje odnosa na višim taksonomskim razinama (koljena i redovi). Upotreba robustnih univerzalnih početnica za 5' kraj gena za COI pokazuje mogućnost identifikacije gotovo svih koljena životinja.²² Međutim unutar gena za ovaj protein postoje i izrazito varijabilna mjesta s visokom mutacijskom stopom (mjesta tihih mutacija), što ga čini pogodnim za detektiranje mlađih evolucijskih događaja.²³ Gen za COI je heterogen u smislu da sadrži mjesta širokog spektra brzina mutacije. Također, COI je najveća od tri podjedinice gena za citokrom oksidaze kodirane mitohondrijskim genomom. Ujedno je i jedan od najvećih mitohondrijskih gena u podcarstvu Metazoa što je povoljno za detektiranje filogenetski važnih signala jer je tako znatan broj informativnih mjesta smješten unutar samo jedne funkcionalne cjeline.²⁰ Usporedbom s genima za rRNA gen za COI pokazuje prednost u procesu poravnavanja zbog smanjene količine insercija i delecija. Brzina molekularne evolucije je također 3 puta veća u odnosu na gene za rRNA. Pravilna identifikacija vrsta ključna je za kvalitetna ekološka i evolucijska istraživanja. Gen za COI pokazao se izuzetnim oruđem u projektima DNA barkodiranja.

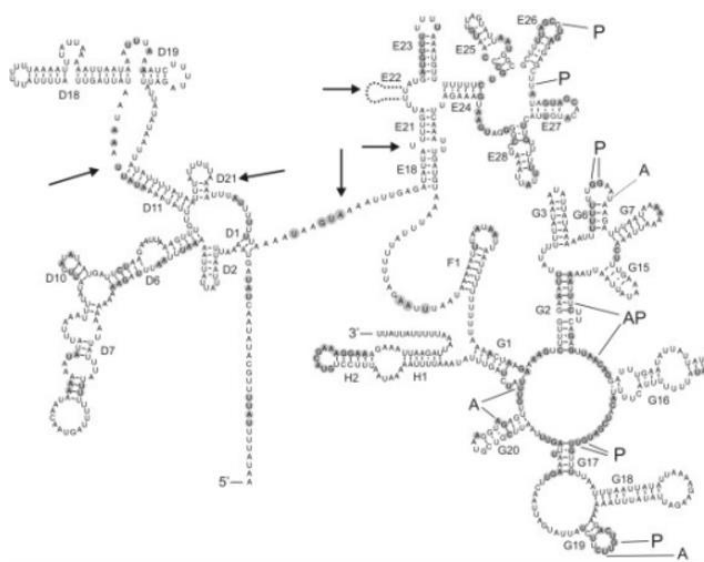
DNA barkodiranje je sustav koji koristi varijabilnost nukleotidnog slijeda mitohondrijskog gena za COI kako bi se identificirale vrste unutar carstva životinja. Ovakvi vrsno specifični fragmenti DNA nazivaju se „barkodovi“.²⁴ Razlog upotrebe ovakvog pristupa u bio-identifikaciji nije samo činjenica da se iz dana u dan broj novo otkrivenih vrsta drastično povećava, već i četiri glavna ograničenja u klasičnoj, morfološkoj determinaciji vrsta: fenotipska i genetička plastičnost, problem kriptičnih vrsta, morfološka svojstva karakteristična samo za jedan životni stadij. Ovakav sustav se pokazao vrlo efikasnim prilikom detekcije srodnih vrsta za što su zaslužna gore navedena svojstva COI. Postoje neslaganja u svezi tehnologije barkodiranja vezane uz opravdanost korištenja jednog gena (COI).^{25,26} Neka alternativna rješenja prikazana su upravo na primjerima kornjaša. Zbog tih nedostataka dolazi do potrebe za dodatnim analiziranjem jezgrinih gena kako bi se riješio problem kompleksnosti vrsta.

12S ribosomska RNA je mitohondrijski kodirana komponenta male podjedinice (engl. Smal subunit (SSU)) ribosoma. Kod ljudi je kodiran sa MT-RNR1 genom te ima duljinu od 951 parova baza. 12S rRNA je mitohondrijski homolog prokariotske 16S i eukariotske 18S ribosomske DNA.²⁷ Sekundarna struktura prikazana je na slici 13. Položaj gena u ljudskom mitohondrijskom genomu prikazan je na slici 15.



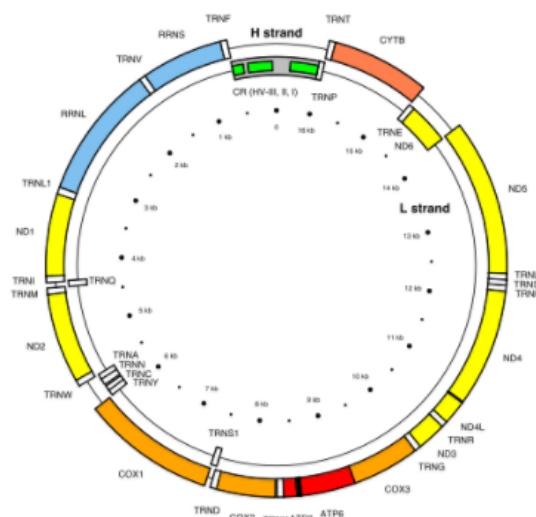
Slika 13. Sekundarna struktura 12S rRNA.¹⁹

16S ribosomska RNA je mitohondrijski kodirana komponenta velike podjedinice (engl. large subunit (LSU)) ribosoma. Kod ljudi je kodiran sa MT-RNR2 genom. 16S rRNA je mitohondrijski homolog prokariotske 23S i eukariotske 28S ribosomske DNA. Predviđenu sekundarnu strukturu se može vidjeti na slici 14., a položaj gena na mitohondrijskoj DNA se može vidjeti na slici 15.²⁹



Slika 14. Prikaz predviđene sekundarne strukture 16S rRNA vrste *Radopholus similis*.²⁹

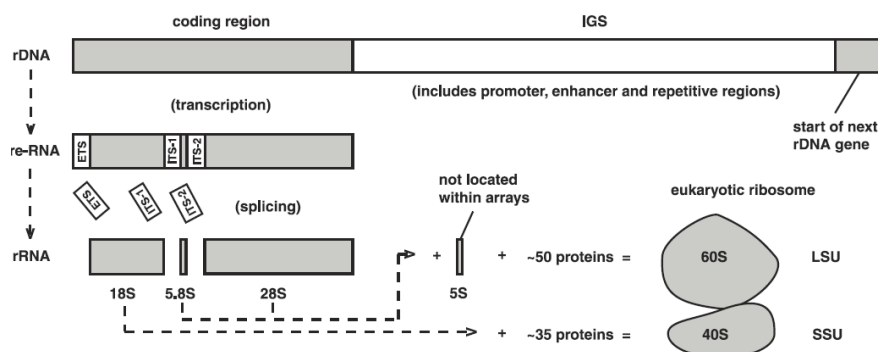
Regija u kojoj se nalaze MT-RNR1 i MT-RNR2 geni ima vrlo sporu evoluciju te je zbog toga pogodna za izradu filogenetskih stabala.



Slika 15. Položaj MT-RNR1 i MT-RNR2 gena na ljudskom mitohondrijskom genomu. Geni za 16S rRNA i 12S rRNA se nalaze u plavo obojanim poljima.²⁹

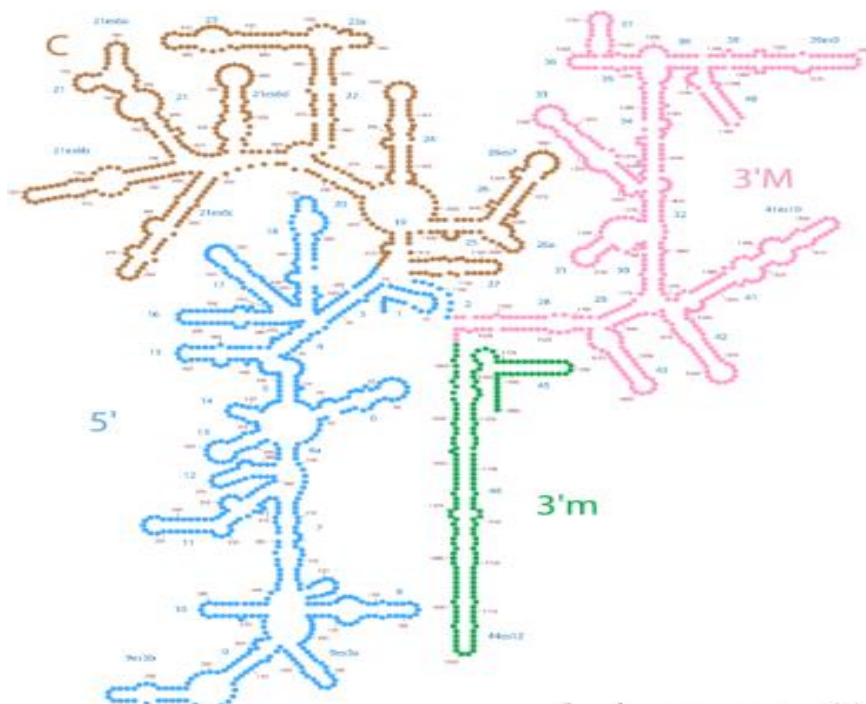
2.1.2.2. Nuklearna DNA

Kao molekularni markeri također su korišteni razni protein kodirajući geni (npr. za ArgK i CAD) te geni za ribosomske podjedinice 18S i 28S (slika 16). Prednost nuklearnih gena nad mitohondrijskim genima je manja brzina (stopa) mutacija. Zbog toga su ti markeri pogodniji za određivanje daljnjih predaka.²⁸



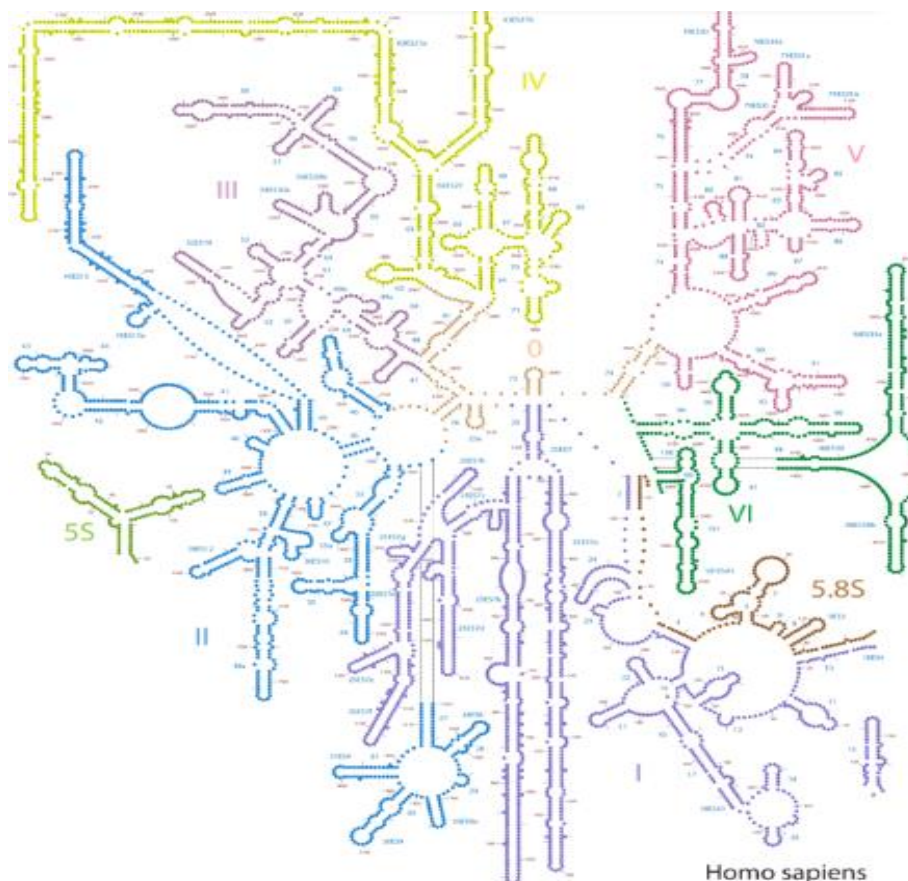
Slika 16. Tipična raspodjela nuklearnih rRNA gena kod eukariota. IGS, intergenski "spacer"; SSU, mala podjedinica; LSU, velika podjedinica.¹⁹

18S ribosomska RNA (slika 17) je strukturna RNA za malu podjedinicu eukariotskih citoplazmatskih ribosoma (40S) te je stoga važna komponenta svih eukariotskih stanica. 18S rRNA ima jako sporu evoluciju pa je vrlo dobro konzervirana i stoga je pogodna za „duboku“ filogeniju.³¹



Slika 17. Sekundarna struktura 18S rRNA kvasca *Sacharomices cerevisiae*.³²

28S ribosomska RNA (slika 18) gradi veliku podjedinicu eukariotskih citoplazmatskih ribosoma, pa je jedna od bazičnih komponenti svih eukariotskih stanica.³³ Ona je eukariotski nuklearni homolog prokariotskog 23S i mitohondrijskog 16S rRNA.³⁴ Za razliku od 18S rRNA, 28S rRNA je puno varijabilnija pa je stoga pogodna za bliža filogenetska istraživanja (npr. unutar porodica).



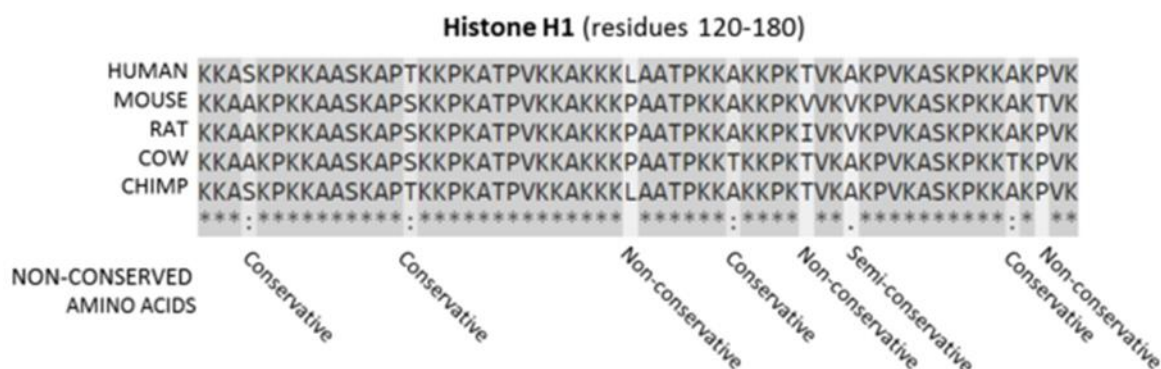
Slika 18. Sekundarna struktura 28S rRNA čovjeka³⁵

2.1.3. Računalne metode u molekularnoj filogenetici

Prvi korak čini ekstrakcija DNA željenog organizma. Nakon ekstrakcije DNA, željeni DNA fragment se umnaža lančanom reakcije polimeraze, PCR reakcijom. Za početnice se obično koriste univerzalne početnice koje su karakteristične za onaj dio gena koji želimo analizirati. Nakon provjere uspješnosti PCR-a umnoženim fragmentima se određuje slijed nukleotida te se analiziraju računalnim metodama.

Računalna filogenetika koristi računalne algoritme, metode i programe za filogenetsku analizu. Cilj računalne filogenetske analize je konstruirati filogenetsko stablo koje reprezentira hipotezu o evolucijskim precima vrsta.³⁴

Poravnanje (eng. “*alignment*“) sekvenci je metoda koja se koristi u bionformatici i ona uključuje poravnanje sekvenci DNA, RNA ili proteina u svrhu identificiranja regija sličnosti. Te regije mogu biti posljedica funkcionalne, strukturne ili evolucijske veze među sekvencama. Poravnane sekvence nukleotida ili aminokiselina su tipično prikazane kao redovi u matrici (slika 19). Prorezi su često umetnuti između ostataka tako da su slične karakteristike poravnane u pojedinačne stupce.³⁴



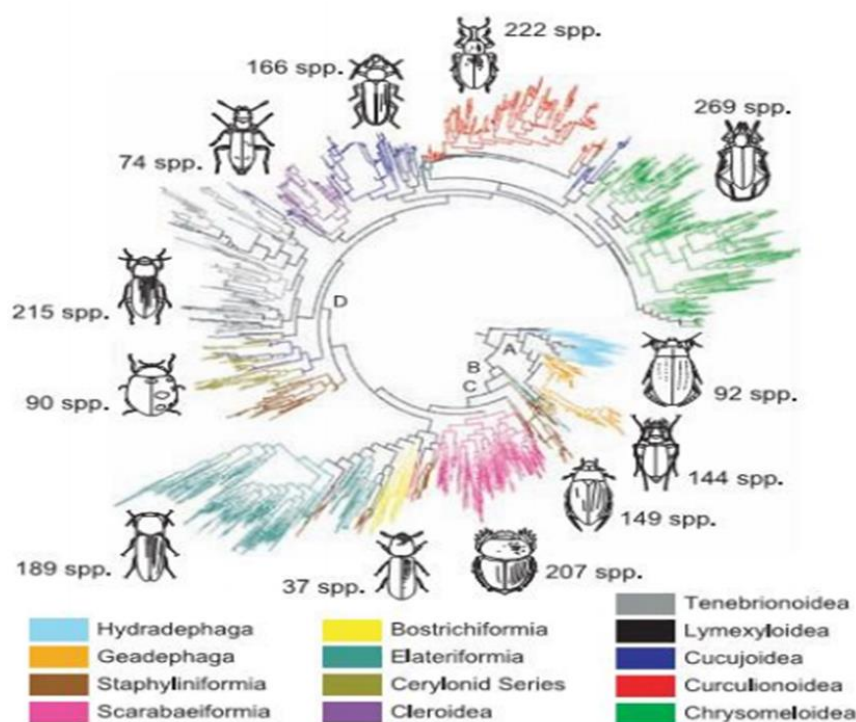
Slika 19. Primjer poravnanja sekvenci histonskog H1 proteina kod sisavaca (čovjek, miš, štakor, govedo, čimpanza). Poravnanje sekvenci je dobiveno korištenjem programa ClustalO. Dijelovi koji su sačuvani kod svih uzoraka su označeni sivo. Ispod sekvenci se nalaze oznake koje označavaju sačuvanu sekvencu (*), konzervativna supstitucija (:), polu konzervativna supstitucija (.) i ne-konzervativna supstitucija.³⁷

Filogenetska stabla koja se sastoje od netrivialnog broja sekvenci se konstruiraju računalnom filogenetikom. Metode koje računaju genetsku udaljenost iz više sekvenci poput sparivanja susjeda (engl. *Neighbor Joining*) ili UPGMA su najlakše za izvođenje, međutim one ne pretpostavljaju evolucijski model.³⁶ Mnoge metode poravnanja sekvenci poput CustalW-a također stvaraju stabla korištenjem jednostavnih algoritama. Metoda maksimalne parsimonije (engl. "*Maximum parsimony*" (MP)) je još jedna jednostavna metoda rekonstrukcije filogenetskih stabala, ali ona uključuje implicitni model evolucije. Naprednije metode koriste kriterij optimalnosti maksimalne vjerojatnosti, vrlo često u Bayesian-ovom okviru te primjenjuju eksplicitni model evolucije na procjenu filogenetskog stabla. Metoda maksimalne vjerojatnosti (eng. "*Maximum likelihood*" (ML)) koristi standardne statističke tehnike za pronalaženje distribucije vjerojatnosti za pojedinačno filogenetsko stablo. Ova metoda zahtijeva model supstitucije da bi procijenila vjerojatnost pojedine mutacije.

Metoda ML za razliku od MP metode ima dodatnu fleksibilnost jer dopušta različite stope evolucije između taksona i između pojedinih dijelova poravnanja.³⁶

2.2. Kornjaši

Kornjaši (Coleoptera) su red člankonožaca koje karakterizira velika raznolikost unutar carstva životinja (slika 20). Unutar razreda kukaca predstavljaju najbogatiji red, uz redove Diptera, Hymenoptera i Lepidoptera. Opisano je oko 400 000 vrsta kornjaša koji su raspoređeni u 170 porodica, no veliki broj vrsta je još neopisan te moderne procjene entomologa ukazuju na čak milijun mogućih vrsta.^{1,38,}

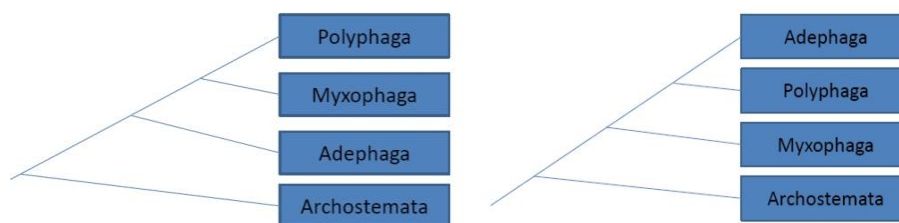


Slika 20. Raznolikost kornjaša.⁵⁶

Kornjaši se dijele na četiri podreda: Polyphaga (raznojedi) s oko 370 000 opisanih vrsta, Adephaga (grabežljivci) s oko 30 000 vrsta, Myxophaga sa 77 vrsta te Archostemata (jedini red s isključivo kopnenim predstavnicima) s 50 vrsta. Kornjaši naseljavaju sve kontinente osim Antarktike te naseljavaju sve biogeografske regije. Procijenjeno je da su se razvili krajem perma (prije 285 milijuna godina) iz kopnenih predaka u području Moravske i Urala nakon čega je brzo došlo do diferencijacije u osnovne podredove kornjaša.^{1,40}

Na temelju analize morfologije i nekih DNA analiza zaključeno je da su se najvjerojatnije prvo odvojili redovi Archostemata, potom Adephaga, dok Myxophaga i Polyphaga čine sestrinsku skupinu.

Međutim na temelju istraživanja koja su isključivo koristila molekularne markere za ribosomsku DNA (18S rRNA, 16S rRNA) i gena za citokrom oksidazu (COI) određen je drugačiji put događaja u evolucijskoj povijesti kornjaša. Archostemata je i dalje prvi podred koji se odjeljuje, zatim ga slijedi Myxophaga te se na kraju odvajaju skupine Polyphaga i Adephaga. Analize mitohondrijskog genoma ukazuju na to da su podredovi Myxophaga i Adephaga sestrinski dok je podred Polyphaga zasebna skupina.¹ Slika 21 prikazuje navedene hipoteze o evoluciji kornjaša.³⁹



Slika 21. Hipoteze o filogenetskim odnosima podredova kornjaša, na lijevoj strani je prikazana tradicionalna hipoteza, a na desnoj jedna od molekularnih hipoteza.^{38,39}

2.2.1. Vodeni kornjaši

Pretpostavlja se da danas na Zemlji postoji oko 18 000 vrsta vodenih kornjaša od čega je opisano otprilike 12 600 vrsta (70 posto od ukupno pretpostavljenog broja). Žive u raznim slatkovodnim vodenim staništima. Također se mogu pronaći u slanim lokvama u obalnom pojasu mora, ali ne i u morskoj vodi. Da bi preživjeli u vodenom okružju kornjaši su razvili nekoliko prilagodbi u načinu disanja. Jaech (1998) je utvrdio šest tipova ekoloških grupa u kojima možemo naći vodene kornjaše. To su: pravi vodeni kornjaši („*true water beetles*“), lažni vodeni kornjaši („*false water beetles*“), fitofilni vodeni kornjaši („*phytophilous water beetles*“), parazitski vodeni kornjaši („*parasitic water beetles*“), fakultativni vodeni kornjaši („*facultative water beetles*“) i obalni vodeni kornjaši („*shore beetles*“). Pravog vodenog kornjaša definiraju prilagodbe na vodeni način života poput prisutnosti plastrona (zračnog omotača koji djeluje kao škrge), modificiranog pokrivanja, plivajućih dlačica na nogama, modificiranih ekstremiteta i hidrodinamičnog tijela. Pravi vodeni kornjaši također moraju biti uronjeni potpuno ili barem djelomično u vodeni medij u jednom od stadija životnog ciklusa. U prave vodene kornjaše ubrajaju se porodice Dytiscidae, Hydraenidae, Hydrophilidae, Elmidae, Scirtidae i Gyrinidae, s ukupno više od 10 000 opisanih vrsta.^{41,39,1}

2.2.2. Porodica Elmidae

Porodica Elmidae (eng. "riffle beetles") skupa s porodicama Dytiscidae, Hydraenidae, Hydrophilidae, Scirtidae i Gyrinidae pripada u prave vodene kornjaše, i to u podred Polyphaga te nadporodicu Byrrhoidea. Ličinke i odrasle jedinke smatraju se pravim vodenim životinjama što znači da jednom kad uđu u vodu ostaju u njoj do kraja života, iako se neki predstavnici podporodice Larinae mogu pronaći u obalnim zonama i zonama prskanja vode. Radi se o malim vrstama s prosječnom duljinom tijela od 1 do 3 mm. Jedan od najvećih rodova *Macrelmis* ima duljinu tijela do 5 mm, dok neke manje vrste imaju duljinu tijela manju od 1 mm. Jaja legu pojedinačno ili u nakupinama ispod potopljenih stijena ili biljaka u kasno proljeće te tijekom ljeta. Razvitak jaja traje od 1 do 2 tjedna nakon čega se izlegu mlade ličinke koje žive od pola do tri godine ovisno o vrsti i temperaturi okoliša. U kasno proljeće zadnji stadij ličinke izgmiže na kopno gdje se zakukulji te nakon 1 do 3 tjedna nastaje mlada odrasla jedinka koja prvi i zadnji put leti do vode. Slika 22. prikazuje primjerak vrste *Elmis aenea*, široko rasprostranjene u Europi.⁴⁰



Slika 22. Vrsta *Elmis aenea*⁴⁰

Ova porodica je jedinstvena, zato što za razliku od ostalih porodica nastanjuje isključivo trajno tekuća staništa. Nastanjuju uglavnom područja u kojima voda struji preko kamene podloge i koja su dobro prozračena. Pronađene su jedinke koje žive na dubinama većim od 10 metara. Vrste porodice Elmidae se sve više prepoznaje kao dobre pokazatelje kvalitete vode (bioindikatori), tipova habitata, biološke funkcionalnosti, te njihovo istraživanje pomaže u izrađivanju konzervacijskih crvenih lista vrsta i staništa.^{41,40,}

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Životinjski materijal

Uzorci kornjaša upotrijebljeni u ovom istraživanju prikupljeni su tijekom provedbe projekta "Taksonomija i filogeografija vodenih kornjaša roda *Elmis*, s osobitim naglaskom na vrste Dinarskog krša" (MZOŠ, bilateralni projekt s Republikom Austrijom za 2016/2017 godinu) i dobiveni su najvećim dijelom od dr. M. Jaecha s Prirodoslovnog muzeja u Beču i dr. V. Mičetić-Stanković s Hrvatskog prirodoslovnog muzeja u Zagrebu

Tablica 1. Životinjski materijal korišten u analizama

Vrsta	porodica / podporodica	lokalitet	datum sakupljanja / sakupio	šifra uzorka
<i>Ancyronyx variegatus</i>	Elmidae / Elminae	SAD: Florida, Santa Rosa	28.VIII.2014. / leg. Hess & Heckes	ANVA-USA1
<i>Elmis aenea</i>	Elmidae / Elminae	Austrija: Donja Austrija: Bad Fischau	I. 2016. / leg. Schönleithner	EA2-NO4
<i>Elmis bosnica</i>	Elmidae / Elminae	BiH: Livno: rijeka Sturba	V. 2012. / Mičetić Stanković	EB102
<i>Elmis latreillei</i>	Elmidae / Elminae	Austrija: Donja Austrija, Uebelbach St. Anton	III. 2015. / leg. Jaech	EL-NO2
<i>Elmis maugetii</i>	Elmidae / Elminae	Francuska: Auvergne, Allier	VII. 2014. / leg. Jaech	EM1-FR7
<i>Elmis obscura</i>	Elmidae / Elminae	Austrija: Gornja Austrija, Okrug. Braunau	IV. 2015. / leg. Jaech	EO1-OO
<i>Elmis perezii</i>	Elmidae / Elminae	Španjolska: provincija Leon	27.VI.2015 / Shaverdo	EP1-ES4
<i>Elmis rioloides</i>	Elmidae / Elminae	Italija: Veneto-Treviso	VI. 2014. / leg. Jaech	ER1-IT3
<i>Elmis sp.</i>	Elmidae / Elminae	Turska: Sapadere	VII. 2015. / leg. Jaech	ERA1-TR4
<i>Esolus parallelepipedus</i>	Elmidae / Elminae	Austrija: Donja Austrija, Okrug.: Baden	25.04.2015 / leg. W. Schönleithner	ESP1-NO3
<i>Graphelmis jaechi</i>	Elmidae / Elminae	Kina: Fujian, Mingxi County	13.XII.2013 / leg. Tong	GEJA-CH2
<i>Limnius muelleri</i>	Elmidae / Elminae	Francuska: Burgundija, La Charité sur Loire	17.V.2014 / Shaverdo leg.	LM-FR10
<i>Macronychus glabratus</i>	Elmidae / Elminae	SAD: Florida, Santa Rosa	28.VIII.2014 / leg. Hess & Heckes	MAGL-USA1
<i>Microcylloepus sp.</i>	Elmidae / Elminae	Kolumbija: rijeka Marayal	3.III.2015	MCSP1-CO25

<i>Macrelmis sp.</i>	Elmidae / Elminae	Kolumbija: rijeka Marayal	3.III.2015	MESP-CO25
<i>Oulimnius rivularis</i>	Elmidae / Elminae	Italija: Sardinija: Giara di Gesturi	14.X.2015, leg. Köhler	OR-IT5
<i>Peloriolus sp.</i>	Elmidae / Elminae	Južna Afrika: Jonkerskoek	8.II.2015. / leg. Bilton	PESP-SA1
<i>Riolus wichmanni</i>	Elmidae / Elminae	Austrija: Donja Austrija: Bad Fischau	leg. Schönleithner	RWS1-NO5
<i>Stenelmis consobrina</i>	Elmidae / Elminae	Italija: Toskana, rijeka Formone	10.IX.2015 / leg. Komarek & Beutel	SC1-IT4
<i>Potamophilinus sp.</i>	Elmidae / Larinae	Indonezija: Zapadna PapuaWest Papua, Batanta	2015 / leg. Kovacs	PPSP1-WP7
<i>Potamocares sp.</i>	Elmidae / Larinae	Etiopija: rijeka Berga	25.II.2014 / leg. Jäch	PCSP-ET27
<i>Potamophilus acuminatus</i>	Elmidae / Larinae	Austrija: Donja Austrija Bez. Gänserndorf	IV. 2015. / leg. Jaech	PA-NO1
<i>Parahelichus sp.</i>	Dryopidae	Sjeverni Vijetnam: Bac Giang	V.2015 / leg. Skale	PASP-NV4
<i>Haplelmis sp.</i>	Protelmidae	Južna Afrika: Jonkerskoek	8.II.2015. / leg. Bilton	HESP-SA1
<i>Cephalobyrrhus sp.</i>	Limnichidae	Sjeverni Vijetnam, Cao Bang	V.2014. / leg. Weigel	CBSP-NV3
<i>Limnius opacus</i>	Elmidae/Elminae	Španjolska: Cadiz: Arroyo de los Bocaleones	20.II.2014, leg. Köhler	LO-ES9
<i>Elmis bosnica</i>	Elmidae/Elminae	Izvor Galičke rijeke (Makedonija)	2010., Mičetić Stanković	EB144

3.1.2. Kemikalije upotrijebljene u molekularnim istraživanjima

- agaroz: SeaKem LE Agarose (Cambrex)

- etidijev bromid (EtBr) 10 mg/ml

- pufer za elektroforezu u gelu agaroze:

a) koncentrirana otopina 50 x TAE pufer (2 M tris-acetat, 50 mM EDTA pH:8)

b) radna otopina 1 x TAE s etidijevim bromidom (0,5 ng/ml)

- standard za duljinu odsječaka DNA: "O'Gene Ruler DNA ladder mix" (0,1 mg/ml) (Fermentas)

- sastojci smjese za lančanu reakciju polimerazom (PCR master mix): smjesa dNTP-ova 10 mM (Qiagen), PCR pufer 5 x green GoTaq flexi buffer (Promega), MgCl₂, 25 mM (Promega), DNA polimeraza "GoTaq Flexi DNA polymerase" 5U/μl (Promega), početnice (Macrogen)

- smjesa za direktno pročišćavanje PCR uzoraka: enzimi egzonukleaza (20 U/ μ l) i alkalna fosfataza (1 U/ μ l) (ThermoScientific)

Tablica 2. Početnice za različite markere korištene u analizi

gen	početnica	nukleotidni slijed 5' -> 3'	izvor
COI	TL2-N-3014 (Pat)	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	Simon et al 1994
COI	C1-J-2441 (Dick)	CCAACAGGAATTAATAATTTTAGATGATTAGC	Simon et al 1994
12S rRNA	SR-J-14233	AAGAGCGACGGGCGATGTGT	Simon et al 1994
12S rRNA	SR-N-14588	AACTAGGATTAGATACCCTATTAT	Simon et al 1994
16S rRNA	LR-N-13398	CGCCTGTTTAACAAAAACAT	Simon et al 1994
16S rRNA	LR-J-12887	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	Simon et al 1994
18S rRNA	F01	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	Medlin et al 1988
18S rRNA	R01	TGATCCTTCCGCAGGTTACCTAC	Medlin et al 1988
28S rRNA	28SF	GACTACCCCTGAATTTAAGCAT	Kim et al 2000
28S rRNA	28SR	GACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAG	Kim et al 2000
CAD	CAD_743nF	GGNGTNACNACNGCNTGYTTYGARCC	Wahlberg & Wheat 2008
CAD	CAD_1028R	TTRTTNGGNARYTGNCNCCCAT	Wahlberg & Wheat 2008
ArgK	AK168F	CAGGTTTGGARAAYCACGAYTCYGG	Wild & Maddison 2008
ArgK	AK939R	GCCNCCYTCRGYTCRGTGTGYTC	Wild & Maddison 2008

3.1.3. Kompleti reagenasa upotrebljeni u molekularnim analizama

- Izolacija DNA: "GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (70)" (Sigma)
- Pročišćavanje DNA iz gela agaroze: "QIAquick Gel Extraction Kit (250)" (Qiagen)

3.1.4. Uređaji

- PCR uređaji: MyCycler, Thermal Cycler (Bio-Rad)
- gradijentni PCR uređaj: MyCycler T100 (Bio-Rad)
- UV transiluminator sa sustavom za snimanje agaroznih gelova: G:BOX (Syngene)
- uređaj za napajanje sustava za elektroforezu: Power Pac Basic (Bio-Rad)
- stolna centrifuga: AG minispin 5415 (Eppendorf)
- vaga: Libra (Sartorius Tec Elektronik)
- miješalica: Biovortex V1(G-KISKER)
- termoblok: Major Science Elite

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija genomske DNA

Prije postupka izolacije genomske DNA, životinje su namakane oko 5 minuta u 50 μ l Re vode da bi se smekšale te kako bi se olakšala ekstrakcija DNA iz tkiva s obzirom da su dugo vremensko razdoblje uzorci držani u etanolu. Izolacija genomske DNA izvršena je pomoću Sigma paketa prateći upute proizvođača za postupak u kojem se koristi stolna centrifuga. Tkiva uzoraka su prvo razgrađena otopinom za razgrađivanje nakon čega je napravljena liza stanica. Nakon lize stanica otopina je nanešena na kolonicu te je dva puta isprana puferom za ispiranje, nakon čega je eluirana. Jedina izmjena je u koraku elucije u kojem je volumen s kojima se eluirala DNA s membrane smanjen sa preporučenih 200 μ l na 100 μ l radi povećanja koncentracije konačne DNA.

3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Nakon izolacije DNA uslijedilo je umnožavanje željenih molekularnih markera procesom lančane reakcije polimerazom (PCR). Prethodno su određene optimalne temperature za sparivanje pojedinog para počentica s DNA kalupom.

Tablica 3. Uvjeti pri kojima su provedne PCR reakcije za gene COI, 12S rRNA i 16S rRNA

Faza PCR reakcije	Temperatura/°C	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	5 min	1
Denaturacija	95	45 sec	35
Sparivanje početnica	56	45 sec	
Produljivanje lanaca DNA	72	45 sec	
Završno produljivanje lanaca DNA	72	10 min	1

Tablica 4. Uvjeti pri kojima su provedne PCR reakcije za 28S rRNA

Faza PCR reakcije	Temperatura/°C	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	5 min	1
Denaturacija	95	45 sec	40
Sparivanje početnica	56	45 sec	
Produljivanje lanaca DNA	72	1 min 15 sec	
Završno produljivanje lanaca DNA	72	10 min	1

Tablica 5. Uvjeti pri kojima su provedene PCR reakcije za 18S rRNA, ArgK i CAD

Faza PCR reakcije	Temperatura/°C	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	5 min	1
Denaturacija	95	45 sec	40
Sparivanje početnica	52	45 sec	
Produljivanje lanaca DNA	72	1 min 15 sec	
Završno produljivanje lanaca DNA	72	10 min	1

3.2.3. Razdvajanje fragmenata DNA u gelu agaroze

Uspješnost PCR reakcije provjerena je elektroforezom u gelu agaroze. Korišten je 1%-tni agarozni gel koji je pripremljen otapanjem 0.3 g agaroze u 30 ml 1X TAE elektroforetskog pufera (radna koncentracija) s dodanim etidijevim bromidom koncentracije 5 µg/ml. Za otapanje agaroze je korištena mikrovalna pećnica. U jažice je nanošeno po 3 µl PCR produkta za svaki uzorak. Elektroforeza je provedena u gore navedenom puferu u istosmjernom električnom polju jakosti 60 V u trajanju od 45 minuta. Nakon elektroforeze, uspješnost PCR-a provjerena je UV transiluminatorom sa sustavom za snimanje agaroznih gelova. Duljina odsječaka DNA dobivenih PCR reakcijom uspoređena je sa standardom za duljinu odsjeka "O'Gene Ruler DNA ladder mix" koncentracije 1 µg/ml.

3.2.4. Pročišćavanje PCR produkata

3.2.4.1. Pročišćavanje PCR produkta enzimatskom reakcijom

Ukoliko se utvrdilo da su nastali samo specifični PCR produkti, oni su pročišćavani dodatkom enzima egzonukleaze (0,4 U/µl PCR smjese) i alkalne fosfataze (AP; 0,1 U/µl PCR smjese). Svrha dodataka tih enzima je pročišćavanje PCR smjese od preostalih neugrađenih nukleotida hidrolizom (enzimom alkalna fosfataza) i razgradnja jednolančanih početnica (enzimom egzonukleaza).

3.2.4.2. Pročišćavanje fragmenta DNA iz gela agaroze

Ponekad nisu dobiveni potpuno čisti produkti PCR reakcije. Uz željene fragmente također su nastajali neželjeni, nespecifični DNA fragmenti različitih duljina koji bi mogli smetati prilikom određivanja nukleotidnog slijeda (sekvenciranja). U takvim slučajevima rađeno je pročišćavanje specifičnog produkta iz gela agaroze.

Ono je rađeno tako da je preostali volumen PCR smjese (12-13 μ l) nanešen na šire i dublje jažice te je opet izvršena elektroforeza. Nakon nekog vremena tijekom elektroforeze je snimljen na UV transiluminatoru te ukoliko je procijenjeno da se željeni i neželjeni fragmenti nalaze na dovoljno velikoj udaljenosti iz gela je pomoću skalpela izrezan komadić agaroze koji sadrži specifični odsječak DNA. Ekstrakcija DNA iz komadića agaroze je vršena pomoću kompleta reagenasa "QIAquick Gel extraction Kit" prema uputama proizvođača. Kao finalni eluat uzimao se volumen od 30 μ l.

3.2.5. Određivanje nukleotidnog slijeda PCR produkata

Nakon pročišćavanja PCR produkata uzorci su poslani na određivanje nukleotidnog slijeda (sekvenciranje) u firmu Macrogen u Nizozemsku. Za sekvenciranje su korištene iste početnice kao i za umnažanje lančanom reakcijom polimeraze.

3.2.6. Bioinformatička analiza

Autentičnost nukleotidnih slijedova utvrđena je korištenjem alata za pretraživanje po sličnosti ("Basic local alignment search tool", BLAST). Nukleotidnim slijedovima koji su uzeti za istraživanje uređeni su krajevi te je uspoređena točnost očitanih molekula obzirom na dobivene kromatograme. Za pregledavanje i uređivanje nukleotidnih slijedova korišten je program BioEdit. Svi uspješno određeni nukleotidni slijedovi su pohranjeni u bazu podataka GenBank. Datoteke za unos u GenBank bazu podataka kreirane su pomoću programa Sequin.

Popis svih uspješno sekvenciranih uzoraka te pregled pristupnih brojeva nukleotidnih slijedova korištenih za istraživanje, kao i onih preuzetih iz GenBank baze podataka prikazani su u tablicama 6-12.

Tablica 6. Analizirani uzorci unešeni u GenBank bazu podataka te njihovi pristupni brojevi

šifra uzorka	ime vrste	COI	12S	ArgK	CAD	18S	28S
MAGL-USA	<i>Macronychus glabratus</i>	MF470082	MF410372				MF470027
ANVA-USA1	<i>Ancyronyx variegatus</i>	MF470069	MF410373	MF470032	MF470050	MF469993	MF470011
CBSP-NV3	<i>Cephalobyrrhus sp.</i>	MF470070	MF410374	MF470033			
PCSP-ET27	<i>Potamocares sp.</i>	MF470088	MF410375	MF470045	MF470064		MF470016

EA2-NO4	<i>Elmis aenea</i>	MF470 071	MF410 376	MF470 034	MF470 051	MF469 994	MF470 019
ERA1-TR4	<i>Elmis sp.</i>	MF470 078	MF410 377	MF470 039		MF470 009	
SC1-IT4	<i>Stenelmis consobrina</i>	MF470 092	MF410 378	MF470 049	MF470 049	MF469 998	
PPSP1-WP7	<i>Potamophilinus sp.</i>	MF470 090	MF410 379		MF470 064		MF470 015
PA-NO1	<i>Potamophilus acuminatus</i>	MF470 086	MF410 380	MF470 044	MF470 063	MF470 005	MF470 015
MESP-CO25	<i>Macrelmis sp.</i>	MF470 084	MF410 381	MF470 042	MF470 062	MF469 996	MF470 019
PESP-SA1	<i>Peloriolus sp.</i>	MF470 089	MF410 382	MF570 046	MF470 058		MF470 017
EB102	<i>Elmis bosnica</i>	MF470 072	MF410 383	MF470 035	MF470 052	MF470 002	
EO1-OO	<i>Elmis obscura</i>	MF470 075	MF410 384		MF470 054	MF469 997	MF470 024
EM1-FR7	<i>Elmis maugetii</i>	MF470 074	MF410 385	MF470 046		MF470 003	MF470 021
ER1-IT3	<i>Elmis rioloides</i>	MF470 077	MF410 386	MF470 037	MF470 053	MF470 006	MF470 020
ESP1-NO3	<i>Esolus parallelepipedus</i>		MF410 387	MF470 038	MF470 055	MF470 007	MF470 025
LM-FR10	<i>Limnius muelleri</i>	MF470 081	MF410 388	MF470 040	MF470 056	MF470 004	
RWS1-NO5	<i>Riolus wichmanni</i>	MF470 091	MF410 389	MF470 048	MF470 057	MF470 000	MF470 026
OR-IT5	<i>Oulimnius rivularis</i>		MF410 390	MF470 043		MF470 010	MF470 029
EP1-ES4	<i>Elmis perezi</i>	MF470 076	MF410 391				MF470 022
EL-NO2	<i>Elmis latreillei</i>	MF470 073	MF410 392			MF470 001	MF470 023
MCSP1-CO25	<i>Microcylloepus sp.</i>	MF470 083	MF410 393	MF470 041	MF470 061	MF469 995	MF470 012
HESP-SA1	<i>Haplelmis sp.</i>	MF470 080	MF410 394	MF470 039	MF470 068		MF470 030
PASP-NV4	<i>Parahelichus sp.</i>	MF470 087	MF410 395			MF469 999	MF470 031

Tablice 7-12 prikazuju pristupne brojeve i šifre uzoraka iz GenBank baze podataka analiziranih u ovom radu

Tablica 7. Pristupni brojevi i pripadajuće šifre vrsta preuzetih iz baze podataka GenBank za analizu gena ArgK

Vrsta	Šifra	Pristupni broj
<i>Optioservus sp.</i>	KP812352.1 <i>Optioservus sp.</i>	KP812352.1
<i>Lara avara</i>	KP812302.1 <i>Lara avara voucher</i>	KP812302.1

Tablica 8. Pristupni brojevi i pripadajuće šifre vrsta preuzetih iz baze podataka GenBank za analizu gena CAD

Vrsta	Šifra	Pristupni broj
<i>Simplocaria sp.</i>	KM364522.1 <i>Simplocaria sp.</i>	KM364522.1
<i>Nicrophorus apo</i>	JF319139.1 <i>Nicrophorus apo</i>	JF319139.1

Tablica 9. Pristupni brojevi i pripadajuće šifre vrsta preuzetih iz baze podataka GenBank za analizu gena COI

Vrsta	Šifra	Pristupni broj
<i>Ancyronyx tamaraw</i>	HF937373.1 <i>Ancyronyx tamaraw</i>	HF937373.1
<i>Ancyronyx minerva</i>	HF937372.1 <i>Ancyronyx minerva</i>	HF937372.1
<i>Ancyronyx patrolus</i>	HE588178.1 <i>Ancyronyx patrolus</i>	HE588178.1
<i>Ancyronyx schillhammeri</i>	HF937371.1 <i>Ancyronyx schillhammeri</i>	HF937371.1
<i>Ancyronyx schillhammeri</i>	HF937370.1 <i>Ancyronyx schillhammeri</i>	HF937370.1
<i>Cleptelmis sp.</i>	EF209564.1 <i>Cleptelmis sp.</i>	EF209564.1
<i>Grouvellinus nitidus sp.</i>	GU816135.1 <i>Grouvellinus nitidus sp.</i>	GU816135.1
<i>Lucholelmis sp.</i>	EF209575.1 <i>Lucholelmis sp.</i>	EF209575.1
<i>Paramacronychus granulatus</i>	GU816171.1 <i>Paramacronychus granulatus</i>	GU816171.1
<i>Stenelmis miyamotoi</i>	AB764150.1 <i>Stenelmis miyamotoi</i>	AB764150.1
<i>Zaitzevia sp.</i>	GU816162.1 <i>Zaitzevia sp.</i>	GU816162.1

Tablica 10. Pristupni brojevi i pripadajuće šifre vrsta preuzetih iz baze podataka GenBank za analizu gena 12S rRNA

Vrsta	Šifra	Pristupni broj
<i>Cyparium concolor</i>	AF021058.1 <i>Cyparium concolor</i>	AF021058.1
<i>Oxyporus stygicus</i>	AF021049.1 <i>Oxyporus stygicus</i>	AF021049.1
<i>Tachinus luridus</i>	AF021047.1 <i>Tachinus luridus</i>	AF021047.1

Tablica 11. Pristupni brojevi i pripadajuće šifre vrsta preuzetih iz baze podataka GenBank za analizu gena 18S rRNA

Vrsta	Šifra	Pristupni broj
<i>Esolus parallelepipedus</i>	JN619138.1 <i>Esolus parallelepipedus</i>	JN619138.1
<i>Riolus cupreus</i>	JN619139.1 <i>Riolus cupreus</i>	JN619139.1
<i>Lara avara</i>	KP419142.1 <i>Lara avara</i>	KP419142.1
<i>Platycotylus sp.</i>	KP829221.1 <i>Platycotylus sp.</i>	KP829221.1
<i>Bembidion quadrimaculatum</i>	GU556133.1 <i>Bembidion quadrimaculatum</i>	GU556133.1

Tablica 12. Pristupni brojevi i pripadajuće šifre vrsta preuzetih iz baze GenBank za analizu gena 28S rRNA

Vrsta	Šifra	Pristupni broj
<i>Ordobrevia foveicollis</i>	JN619138.1 <i>Ordobrevia foveicollis</i>	JN619138.1
<i>Stenelmis miyamotoi</i>	JN619139.1 <i>Stenelmis miyamotoi</i>	JN619139.1
<i>Ordobrevia maculata</i>	KP419142.1 <i>Ordobrevia maculata</i>	KP419142.1
<i>Graphelmis shirahatai</i>	KP829221.1 <i>Graphelmis shirahatai</i>	KP829221.1
<i>Graphelmis shirahatai</i>	GU556133.1 <i>Graphelmis shirahatai</i>	GU556133.1

3.2.6.1. Višestruko poravnanje nukleotidnih slijedova

Za višestruko poravnanje nukleotidnih slijedova gena koji kodiraju za proteine (COI, CAD i ArgK) upotrebljen je program ClustalW (implementiran unutar programa BioEdit). Za ribosomske gene (12S, 18S i 28S rRNA) upotrebljeni su programi MAFFT i LocARNA koji omogućavaju podešavanje uvjeta i algoritma poravnanja ovisno o strukturi gena. Ribosomski geni su poravnani korištenjem programa MAFT i LocARNA koji prilikom poravnavanja uzima u obzir moguću sekundarnu strukturu ribosomskih RNA. Dijelovi koji nisu mogli biti pouzdano poravnani odstranjeni su iz finalnih poravnanja programom GBlocks pod standardnim uvjetima.

3.2.6.2. Filogenetske analize nukleotidnih slijedova

Unutarvrstne i međuvrstne nekorrigirane genetičke međusobne udaljenosti (*uncorrected pairwise distance*, *p-distance*) izračunate su za svaki set podataka u programu MEGA. Također su u programu MEGA određene vrijednosti sačuvanih mjesta (*Conserved sites* - C)

varijabilnih mjesta (*Variable sites* – V) te parsimonijski informativnih mjesta (*Parsimony informative site* - Pi).

Filogenetske analize provedene su na svakom setu podataka, pojedinačnih gena, te ulančane analize za mitohondrijske gene (COI i 12S rRNA), protein kodirajuće gene (ArgK, CAD, COI), nuklearne gene (18S rRNA, 28S rRNA, ArgK, CAD), ribosomske gene (12S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNA), te sve gene zajedno. Analize su napravljene metodama združivanje susjeda (engl. *Neighbour Joining* (NJ)), i maksimalne vjerojatnosti (engl. *Maximum Likelihood* (ML)). Pri tome su korišteni slijedeći programi: MEGA7 (Tamura i sur., 2007) (za NJ, ML, i PD analize) te jModelTest (Posada, 2008) za odabir najpovoljnijeg modela nukleotidne supstitucije za ML analizu za svaki od setova podataka prema tzv. *Bayesian information criteria* (BIC) parametru.

Prilikom izrade filogenetskih stabala pojedinačnih protein kodirajućih gena (COI, ArgK i CAD) analizirana su sva tri položaja u kodonu, treći i drugi, treći i prvi, drugi i prvi te svaki pojedinačni položaj zasebno. Odabrana su stabla s najboljom *bootstrap* podrškom za pojedini tip metode i set podataka. Kod statističke metode NJ korištene su nekorrigirane međusobne udaljenosti (p-distance) pri čemu su kao tipovi mutacija u analizu uključene tranzicije i transverzije. U analizi statističkom metodom ML za sva tri seta podataka korišteni su prethodno navedeni supstitucijski modeli, a heuristička metoda odabira stabala je *Nearest-Neighbor-Interchange* (NNI). Kod NJ i ML analize pretpostavljene su uniformne brzine evolucije na svim analiziranim pozicijama. Podrška za grananja unutar filogenetskih stabala (*bootstrap* ponavljanja) određena je na temelju 1000 *bootstrap* ponavljanja za NJ analize te na 100 *bootstrap* ponavljanja za ML analizu.

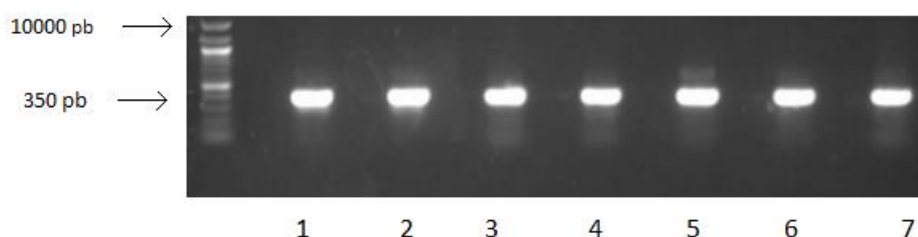
Nakon analiza i provjere dobivenih filogenetskih stabala izabrana filogenetska stabla su doradana u programu FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)

4. REZULTATI

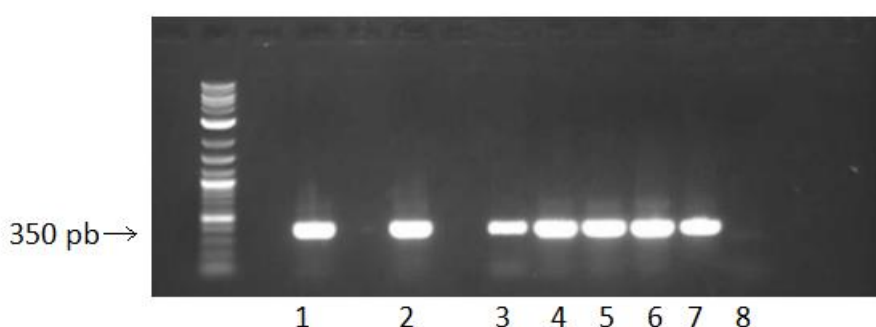
4.1. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

DNA je ekstrahirana iz željenih uzoraka te su ciljani geni umnoženi PCR reakcijom (slike 23-38).

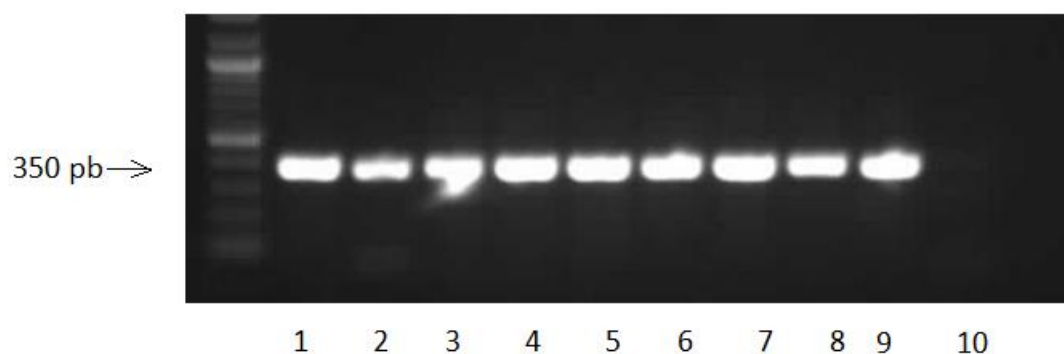
PCR umnažanje 12S rRNA mitohondrijskog gena rezultiralo je specifičnim PCR produktima duljine ~350 pb za sve uzorke (slike 23-37). PCR reakcija je bila uspješna za sve uzorke te su dobiveni rezultati bez nespecifičnih nusprodukata.



Slika 23. Fotografija gel elektroforeze PCR reakcije gena za 12S rRNA. U označenim jažicama se nalaze slijedeći uzorci: 1. EA2-NO4, 2. EB102, 3. EL-NO2, 4. EM1-FR7, 5. EO1-OO, 6. EP1-ES4, 7. ER1-IT3.

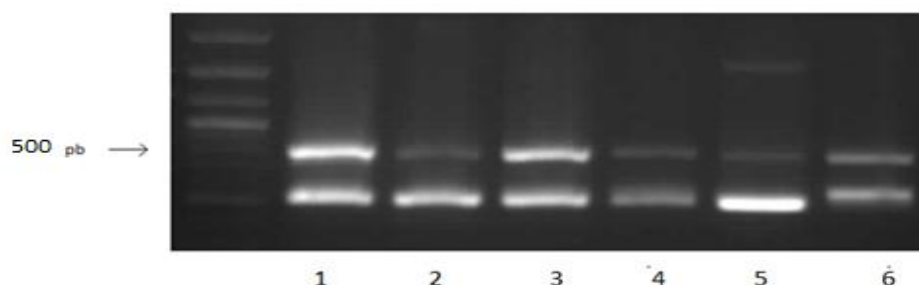


Slika 24. Fotografija gel elektroforeze PCR reakcije gena za 12S rRNA. U označenim jažicama se nalaze slijedeći uzorci: 1. ANVA-USA1, 2. CBSP-NV3, 3. ERA1-TR4, 4. ESP1-NO3, 5. HESP-SA1, 6. LM-FR10, 7. MCSP1-CO25, 8. negativna kontrola.

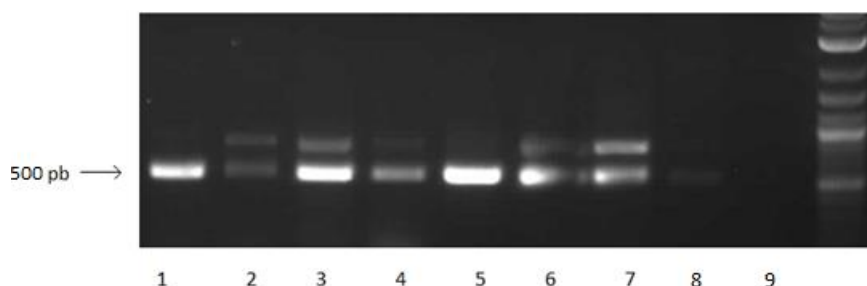


Slika 25. Fotografija gel elektroforeze PCR reakcije gena za 12S rRNA. U označenim jažicama nalaze se slijedeći uzorci: 1. MESP-CO25, 2. OR-IT5, 3. PA-NO1, 4. PASP-NV4, 5. PCSP-ET27, 6. PESP-SA1, 7. PPSP1-WP7, 8. RWS1-NO5, 9. SC1-IT4, 10. negativna kontrola.

PCR umnažanje gena za 16S rRNA rezultiralo je specifičnim PCR produktima duljine ~500 pb za sve uzorke (slike 26-27). Iz fotografija se može vidjeti da osim specifičnih produkata, gotovo svi uzorci sadrže i nespecifične produkte.

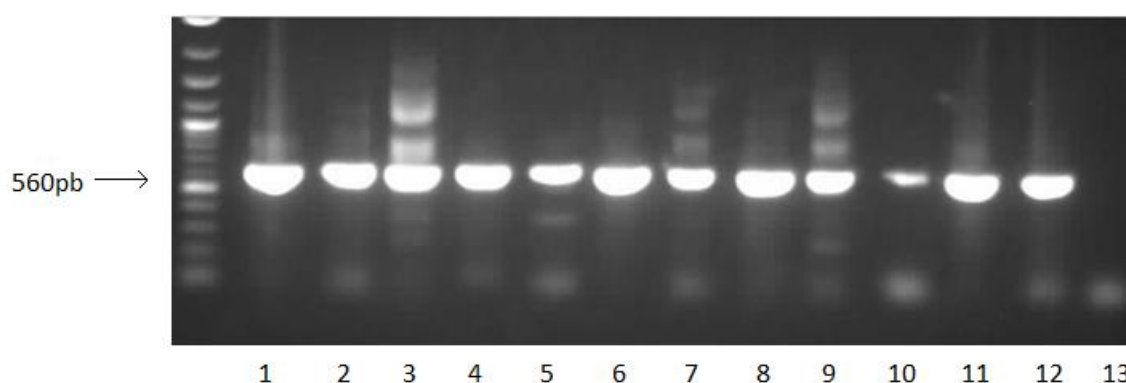


Slika 26. Fotografija gel elektroforeze PCR reakcije gena za 16S rRNA. U označenim jažicama se nalaze slijedeći uzorci: 1. ANVA-USA1, 2. EA2-NO4, 3. EM1-FR7, 4. EO1-OO, 5. ERA1-TR4, 6. ESP1-NO3.

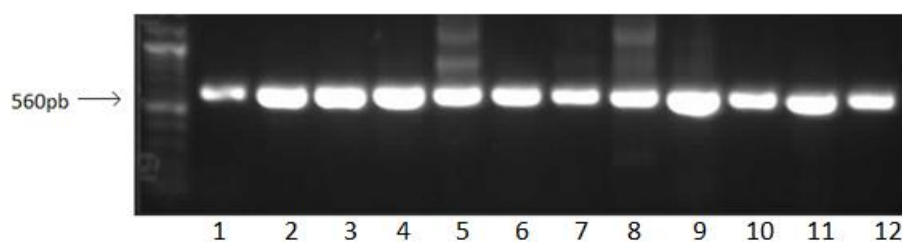


Slika 27. Fotografija gel elektroforeze PCR reakcije gena za 16S rRNA. U označenim jažicama se nalaze slijedeći uzorci: 1. HESP-SA1, 2. LM-FR10, 3. MCSP1-CO25, 4. OR-IT5, 5. PASP-NV4, 6. PESP-SA1, 7. PPSP1-WP7, 8. SC1-IT4, 9. negativna kontrola

PCR umnažanje gena za COI rezultiralo je specifičnim PCR produktima duljine ~560 pb za sve uzorke (slike 28-29). PCR reakcija je bila uspješna za sve uzorke. Iz fotografija se može vidjeti da je kod nekih uzoraka došlo do nastajanja nespecifičnih produkata te je zbog toga specifične produkte bilo potrebno izrezivati iz gela.

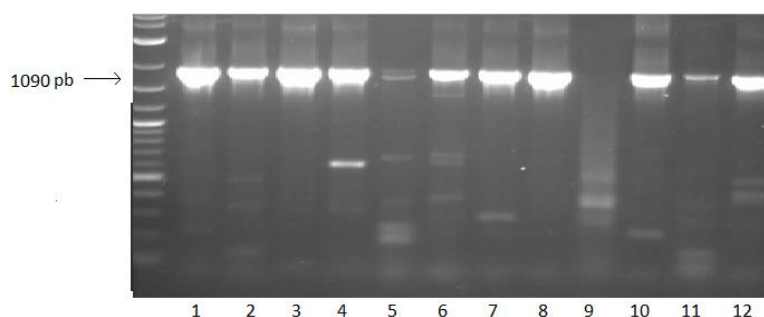


Slika 28. Fotografija gel elektroforeze PCR reakcije gena za COI. U označenim jažicama se nalaze slijedeći uzorci: 1. ANVA-USA1, 2. EA2-NO4, 3. EL-NO2, 4. EO1-OO, 5. ER1-IT3, 6. ESP1-NO3, 7. HESP-SA1, 8. MAGL-USA1, 9. MESP-CO25, 10. PA-NO1, 11. PCSP-ET27, 12. PPSP1-WP7, 13. negativna kontrola.

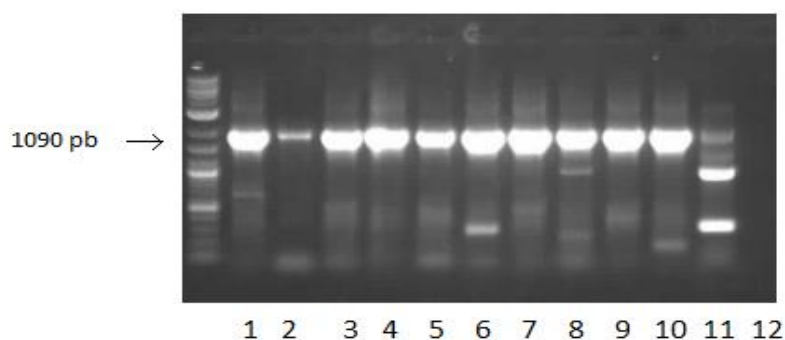


Slika 29. Fotografija gel elektroforeze PCR reakcije gena za COI. U označenim jažicama se nalaze slijedeći uzorci: 1. CBSP-NV3, 2. EB102, 3. EM1-FR7, 4. EP1-ES4, 5. ERA1-TR4, 6. GEJA-CH2, 7. LM-FR10, 8. MCSP1-CO25, 9. OR-IT5, 10. PASP-NV4, 11. PESP-SA1, 12. RWS1-NO5

PCR umnažanje 18S rRNA nuklearnog gena rezultiralo je specifičnim PCR produktima duljine ~1090 pb za sve uzorke (slike 30-31). PCR reakcija je bila uspješna za sve uzorke. Iz fotografija se može vidjeti da je kod nekih uzoraka došlo do nastajanja nespecifičnih produkata te je zbog toga specifične produkte bilo potrebno izrezivati iz gela.

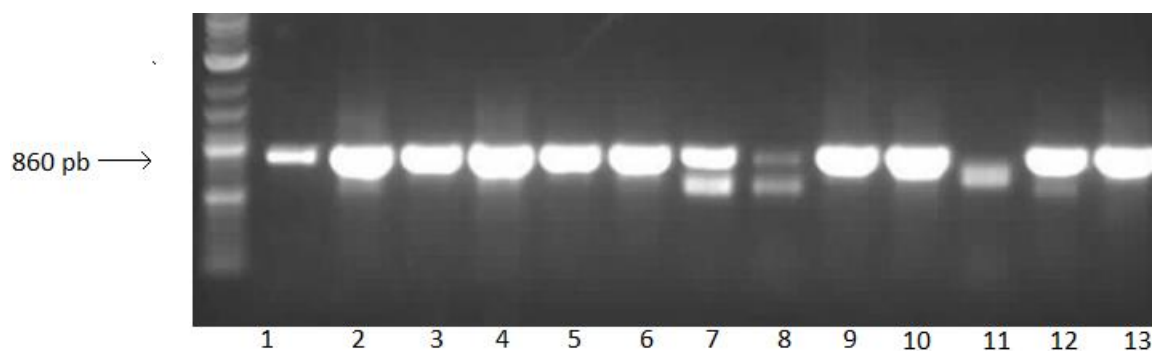


Slika 30. Fotografija gel elektroforeza PCR reakcije gena za 18S rRNA. U označenim jažicama se nalaze slijedeći uzorci: 1. ANVA-USA1, 2. EA2-NO4, 3. EB102, 4. EL-NO2, 5. CBSP-NV3, 6. EM1-FR7, 7. EO1-OO, 8. EP1-ES4, 9. GEJA-CH2, 10. ER1-IT3, 11. HESP-SA1, 12. ERA1-TR4

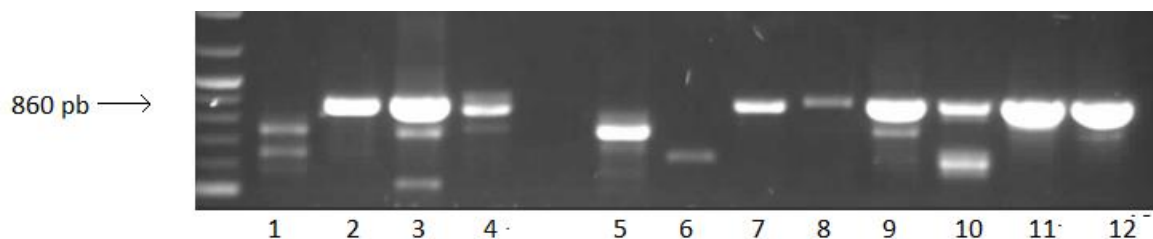


Slika 31. Fotografija gel elektroforeze PCR reakcije za gen 18S rRNA. U označenim jažicama se nalaze slijedeći uzorci: 1. ESP1-NO3, 2. MAGL-USA1, 3. LM-FR10, 4. MCSP1-CO25, 5. MESP-CO25, 6. OR-IT5, 7. PA-NO1, 8. PASP-NV4, 9. RWS1-NO5, 10. SC1-IT4, 11. PPSP1-WP7, 12. negativna kontrola

PCR umnažanje gena za 28S rRNA rezultiralo je specifičnim PCR produktima duljine ~860 pb za sve uzorke (slike 32-33). PCR reakcija je bila uspješna za sve uzorke. Iz fotografija se može vidjeti da je kod nekih uzoraka došlo do nastajanja nespecifičnih produkata te je zbog toga specifične produkte bilo potrebno izrezivati iz gela.

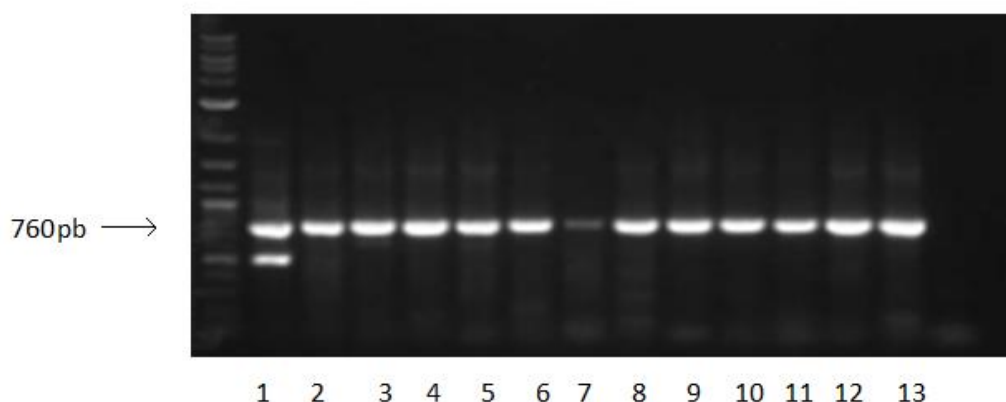


Slika 32. Fotografija gel elektroforeze PCR reakcije gena za 28S rRNA. U označenim jažicama se nalaze slijedeći uzorci: 1. ANVA-USA1, 2. CBSP-NV3, 3. EA2-NO4, 4. EL-NO2, 5. EM1-FR7, 6. EO1-OO, 7. EP1-ES4, 8. ER1-IT3, 9. ESP1-NO3, 10. GEJA-CH2, 11. ERA1-TR4, 12. HESP-SA1, 13. MAGL-USA1

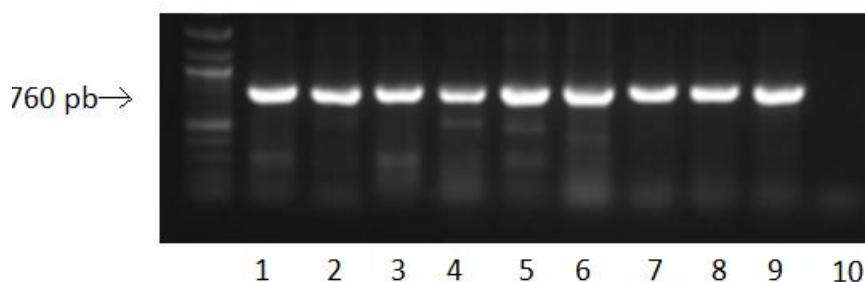


Slika 33. Fotografija gel elektroforeze PCR reakcije gena za 28S rRNA. U označenim jažicama se nalaze slijedeći uzorci: 1. RWS1-NO5 , 2. MCSP1-CO25, 3. MESP-CO25, 4. OR-IT5, 5. ERA1-TR4, 6. LM-FR10 , 7. PA-NO1, 8. PASP-NV4, 9. PCSP-ET27, 10. PESP-SA1, 11. PPSP1-WP7, 12. SC1-IT4

PCR umnažanje gena za ArgK rezultiralo je specifičnim PCR produktima duljine ~760 pb za sve uzorke (slike 34-35). PCR reakcija je bila uspješna za sve uzorke. Iz fotografija se može vidjeti da je kod nekih uzoraka došlo do nastajanja nespecifičnih produkata te je zbog toga specifične produkte bilo potrebno izrezivati iz gela.

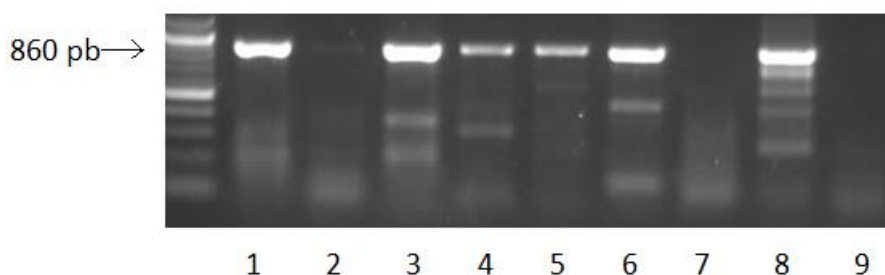


Slika 34. Fotografija gel elektroforeze PCR reakcije gena za ArgK. U označenim jažicama se nalaze slijedeći uzorci: 1. ANVA-USA1, 2. CBSP-NV3, 3. EA2-NO4, 4. EB102, 5. EM1-FR7, 6. EO1-OO, 7. ER1-IT3, 8. ESP1-NO3, 9. HESP-SA1, 10. LM-FR10, 11. MCSP1-CO25, 12. MESP-CO25, 13. MAGL-USA1

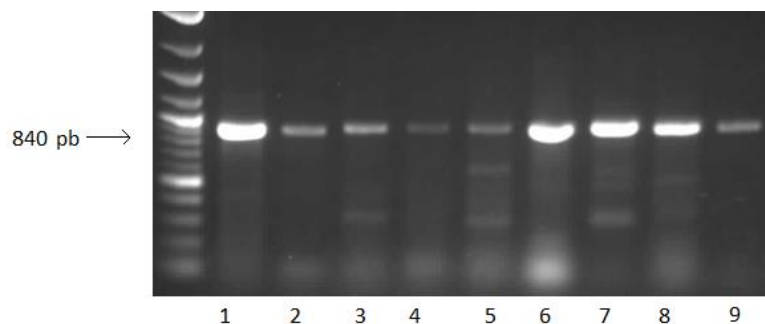


Slika 35. Fotografija gel elektroforeze PCR reakcije gena za ArgK. U označenim jažicama se nalaze slijedeći uzorci: 1. CBSP-NV3, 2. MCSP1-CO25, 3. OR-IT5, 4. PA-NO1, 5. PCSP-ET27, 6. PESP-SA1, 7. PPSP1-WP7, 8. RWS1-NO5, 9. SC1-IT4, 10. negativna kontrola.

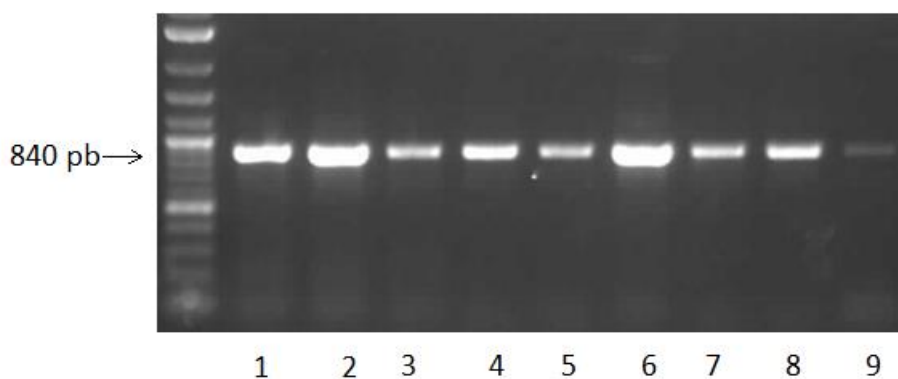
PCR umnažanje gena za CAD rezultiralo je specifičnim PCR produktima duljine ~860 pb za većinu uzoraka (slike 36-38). PCR reakcija je bila uspješna za većinu uzoraka. Iz fotografija se može vidjeti da je kod nekih uzoraka došlo do nastajanja nespecifičnih produkata te je zbog toga specifične produkte bilo potrebno izrezivati iz gela.



Slika 36. Fotografija gel elektroforeze PCR reakcije gena za CAD. U označenim jažicama se nalaze slijedeći uzorci: 1. ANVA-USA1, 2. EL-NO2, 3. CBSP-NV3, 4. EA2-NO4, 5. EB102, 6. EM1-FR7, 7. EP1-ES4, 8. EO1-OO, 9. negativna kontrola.



Slika 37. Fotografija gel elektroforeze PCR reakcije gena za CAD. U označenim jažicama se nalaze slijedeći uzorci: 1. ER1-IT3, 2. ESP1-NO3, 3. HESP-SA1, 4. GEJA-CH2, 5. ERA1-TR4, 6. LM-FR10, 7. MAGL-USA1, 8. MCSP1-CO25, 9. PASP-NV4



Slika 38. Fotografija gel elektroforeze PCR reakcije za protein kodirajući gen za CAD. U označenim jažicama se nalaze slijedeći uzorci: 1. MESP-CO25, 2. OR-IT5, 3. PA-NO1, 4. PCSP-ET27, 5. PESP-SA1, 6. PPSP1-WP7, 7. RWS1-NO5, 8. SC1-IT4, 9. PASP-NV4

PCR reakcije za većinu uzoraka i setova gena su bile uspješne. Kod nekih uzoraka je došlo do nastajanja nespecifičnih produkata te su morali biti izrezani iz gela. Nakon pročišćavanja specifični produkti su poslani na sekvenciranje u MacroGen. Uspješnost sekvenciranja (veličina i kvaliteta produkata) provjerena je analizom kromatograma. U prilogima su prikazani reprezentativni kromatogrami za svaki od gena.

4.2. BLAST analize

Nakon sekvenciranja svi su uzorci uspoređeni s nukleotidnim slijedovima pohranjenim u NCBI bazi podataka upotrebom BLAST alata. Za sve uzorke je ustanovljeno da odgovaraju ciljanim genima porodice Elmidae (odnosno u slučaju vanjskih grupa odgovarajućim porodicama), osim za gen 16S rRNA kod kojeg je za veliki broj uzoraka ustanovljena kontaminacija stranom (bakterijskom) DNA, zbog čega su nukleotidni slijedovi za gen 16S rRNA izbačeni iz daljnjih analiza.

4.3. Poravnanje nukleotidnih slijedova

Tablica 13. Broj analiziranih nukleotida i taksona za svaki set podataka (12S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNA, COI, ArgK, CAD) s pripadajućim vrijednostima sačuvanih mjesta (*Conserved sites*-C), varijabilnih mjesta (*Variable sites*- V) te parsimonijski informativnih mjesta (*parsimony informative sites*-Pi).

Gen	Broj analiziranih nukleotida	Broj analiziranih taksona	Pi	V	C
12S rRNA	319	27	117	195	124
18S rRNA	796	22	35	169	627
28S rRNA	572	25	153	253	319
COI	386	36	161	173	213
ArgK	677	20	256	313	364
CAD	740	21	317	356	358
Mitohondrijski geni (COI i 12S rRNA)	749	24	261	363	366
Ribosomski geni (12S rRNA, 18S rRNA i 28S rRNA)	1687	24	233	501	1186
Nuklearni geni (18S rRNA, 28S rRNA, ArgK i CAD)	2468	19	535	797	1671
Protein kodirajući geni (ArgK, CAD i COI)	1775	19	677	799	976
Svi ulančani	3461	20	866	1253	2028

Dijelovi poravnanja za pojedinačne gene su prikazani u prilogima 4-9, a prikazi sekundarnih struktura za poravnane ribosomske gene 12S rRNA, 18S rRNA i 28S rRNA se nalaze u prilogima 1-3.

4.4. Filogenetske analize

4.4.1. Srodstvene analize gena za COI

Iz dobivenih vrijednosti međusobnih udaljenosti (PD) vrijednosti nukleotidnih slijedova gena za COI izračunate su prosječne vrijednosti unutar pojedinih grupa za sva 3 položaja u kodonu (Tablica 14), samo 1. položaj u kodonu (Tablica 15), samo 2. položaj u kodonu (Tablica 16) i samo 3. položaj u kodonu (Tablica 17). Također su izračunati prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) za set podataka gena za COI unutar i između grupa za sva 3 položaja u kodonu (Tablica 18).

Tablica 14. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) za set podataka gena za COI (sva 3 položaja u kodonu)

Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.16	30
Elmidae/Laraine	0.17	3
Vanjske grupe	0.23	3

Tablica 15. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) za set podataka gena za COI (samo 1. položaj u kodonu)

Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.09	30
Elmidae/Laraine	0.13	3
Vanjske grupe	0.17	3

Tablica 16 . Tablica: Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) za set podataka gena za COI (samo 2. položaj u kodonu)

Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.06	30
Elmidae/Laraine	0.08	3
Vanjske grupe	0.10	3

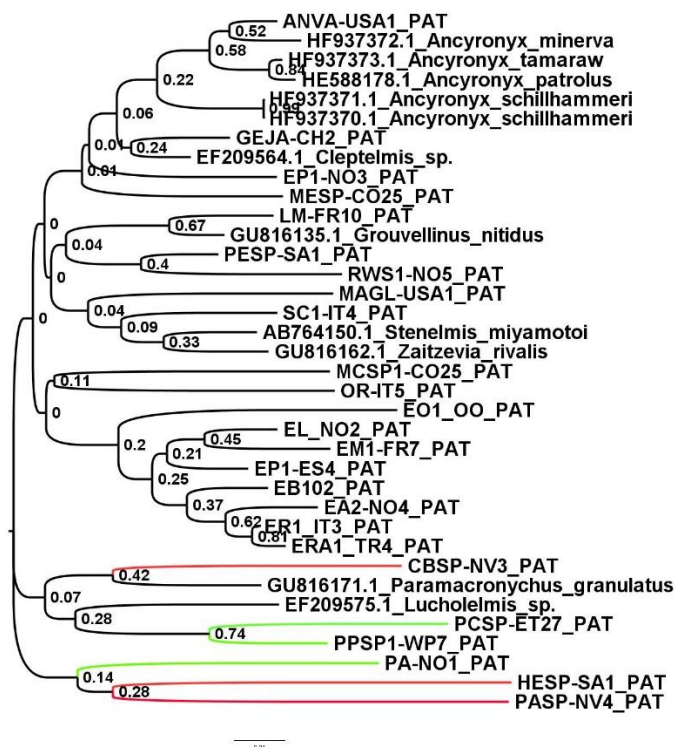
Tablica 17. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) za set podataka gena za COI (samo 3. položaj u kodonu)

Grupa	Prosjeci unutar grupe	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.24	30
Elmidae/Laraine	0.27	3
Vanjske grupe	0.29	3

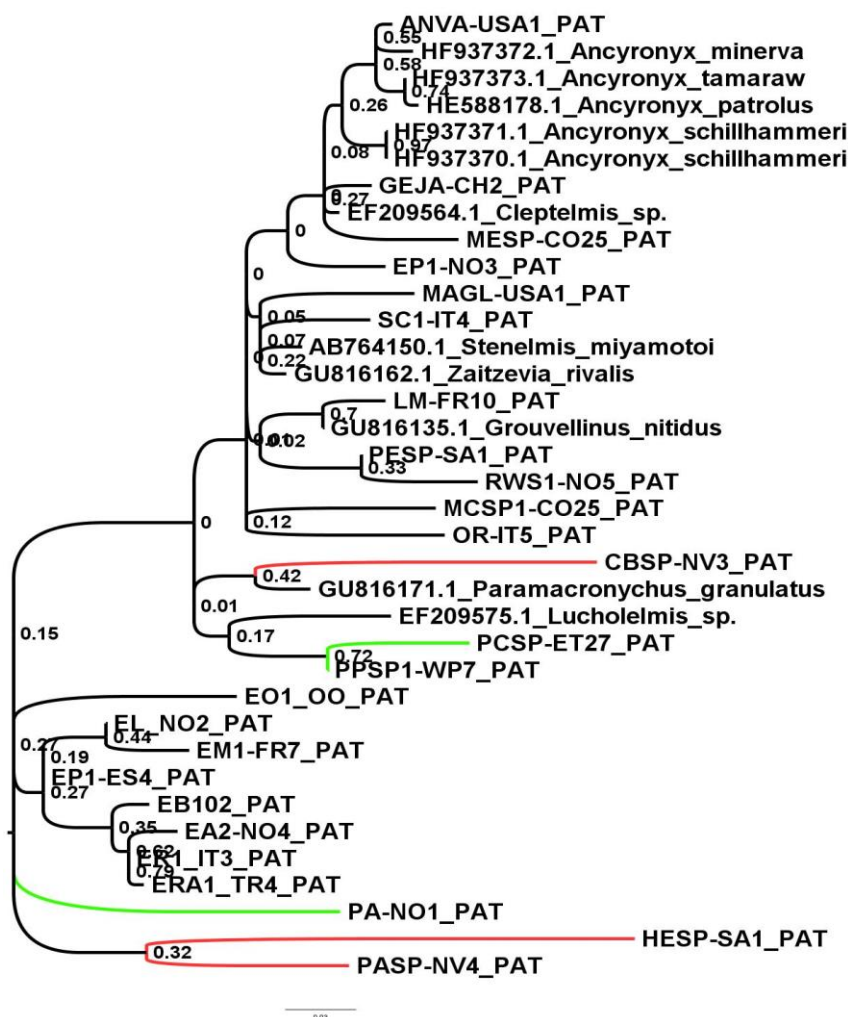
Tablica 18. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za COI unutar i između grupa za sva 3 položaja u kodonu

	Elminae	Larainae	Vanjske grupe
Elminae	0.16		
Larainae	0.19	0.16	
Vanjske grupe	0.21	0.21	0.23

Filogenetske analize statističkim metodama NJ, ML za gen COI uključivale su 1. položaj u kodonu pošto je zaključeno da su preostala dva položaja u kodonu previše varijabilna te ne daju dobre rezultate.



a)



b)

Slika 39. Filogenetska stabla dobivena analizom 1. položaja u kodonu gena za COI uzoraka porodice Elmidae i vanjskih grupa te podataka iz GenBank baze podataka, metodama NJ (a) ("p-distances") i ML (b) (model T92+G). Na granama su označene vrijednosti podrške za čvorove na temelju 1000 (NJ) odnosno 100 (ML) bootstrap ponavljanja. Crna boja označava podporodicu Elminae. Zelenom bojom je označena podporodica Larainae dok su vanjske grupe označene crvenom bojom.

Iz rezultata analize COI gena (slika 39) vidljiva je vrlo slaba razlučenost unutar stabla koja se očituje u niskim vrijednostima podrške za većinu grana, kao i u svrstavanju jednog od taksona vanjske grupe (CBSP-NV3) unutar porodice Elmidae. Niti jedna od dviju podporodica (Elminae i Larainae) nije monofiletska, kao niti rod *Elmis*, dok je rod *Ancyronix* monofiletski, no uz vrlo nisku podršku.

4.4.2. Srodstvene analize gena za 12S rRNA

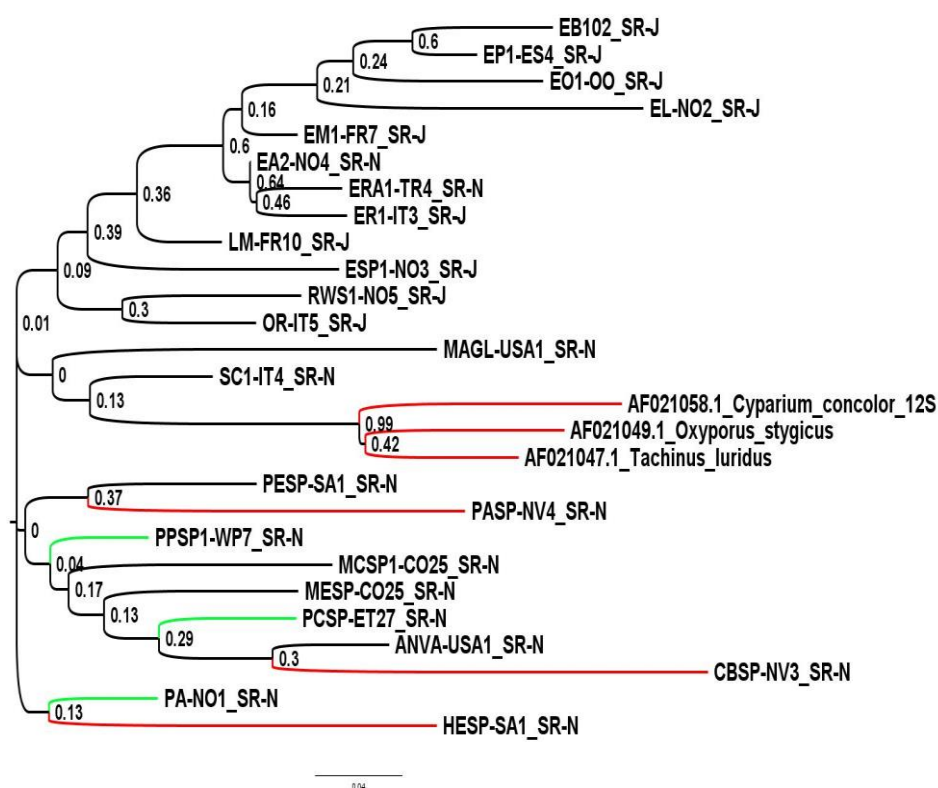
Iz dobivenih međusobnih udaljenosti (PD) vrijednosti nukleotidnih slijedova gena za 12S rRNA izračunate su prosječne vrijednosti unutar pojedinih grupa (Tablica 19). i prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za 12S rRNA (Tablica 20).

Tablica 19. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za 12S rRNA

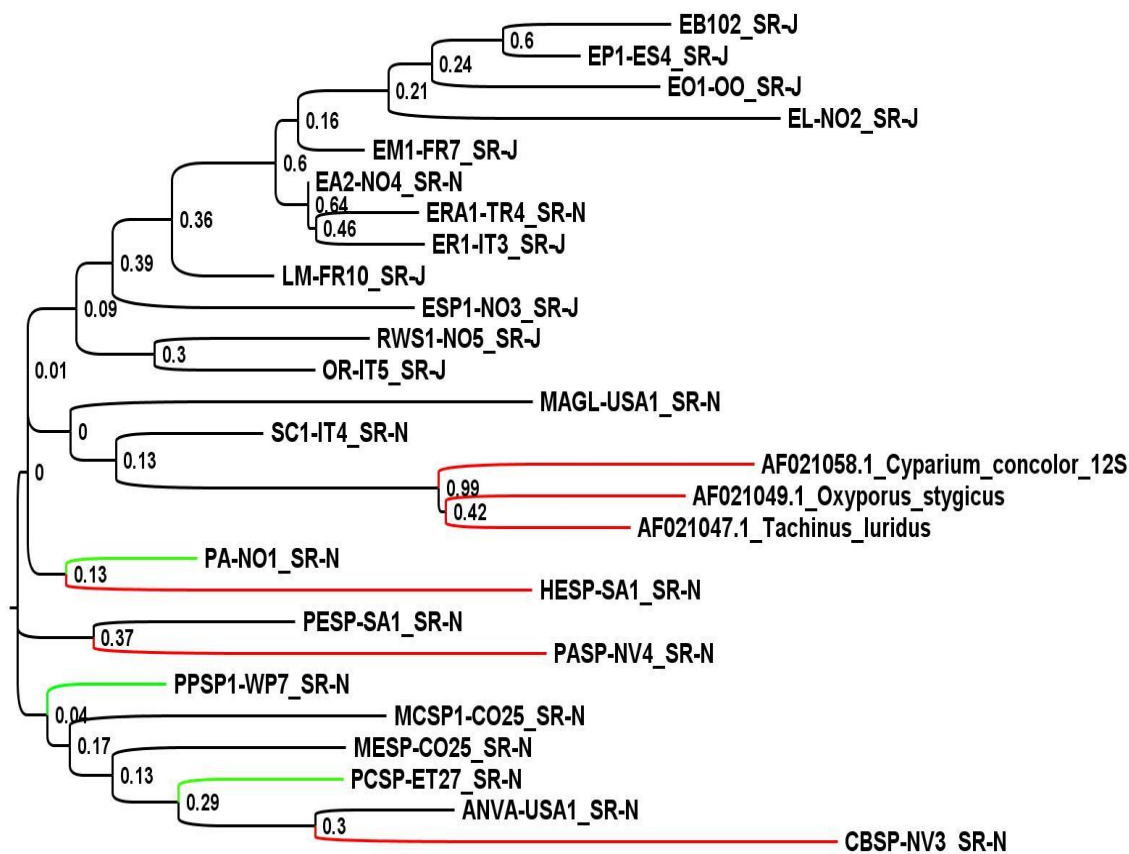
Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.12	17
Elmidae/Laraine	0.12	3
Vanjske grupe	0.18	6

Tablica 20. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za 12S rRNA unutar i između grupa

	Elminae	Larainae	Vanjske grupe
Elminae	0.12		
Larainae	0.12	0.12	
Vanjske grupe	0.18	0.17	0.18



a)



b)

Slika 40. Filogenetska stabla dobivena analizom gena za 12S rRNA uzoraka porodice Elminae i vanjskih grupa te podataka iz GenBank baze podataka metodama NJ (a) ("p-distances") i ML (b) (model HKY+G+I). Na granama su označene vrijednosti podrške za čvorove na temelju 1000 (NJ) odnosno 100 (ML) bootstrap ponavljanja. Crna boja označava podporodicu Elminae. Zelenom bojom je označena podporodica Larainae dok su vanjske grupe označene crvenom bojom.

Kao i u slučaju rezultata analize COI gena, i za 12S rRNA (slika 40) topologija stabla je vrlo slabo razlučena: prisutne su vrlo niske vrijednosti podrške za većinu grana, parafiletske podporodice Elminae i Larainae, kao i vanjska grupa. Rod *Elmis* je monofiletski, uz umjerenu podršku.

4.4.3 Srodstvene analize ulančanih mithondrijskih gena (COI i 12S rRNA)

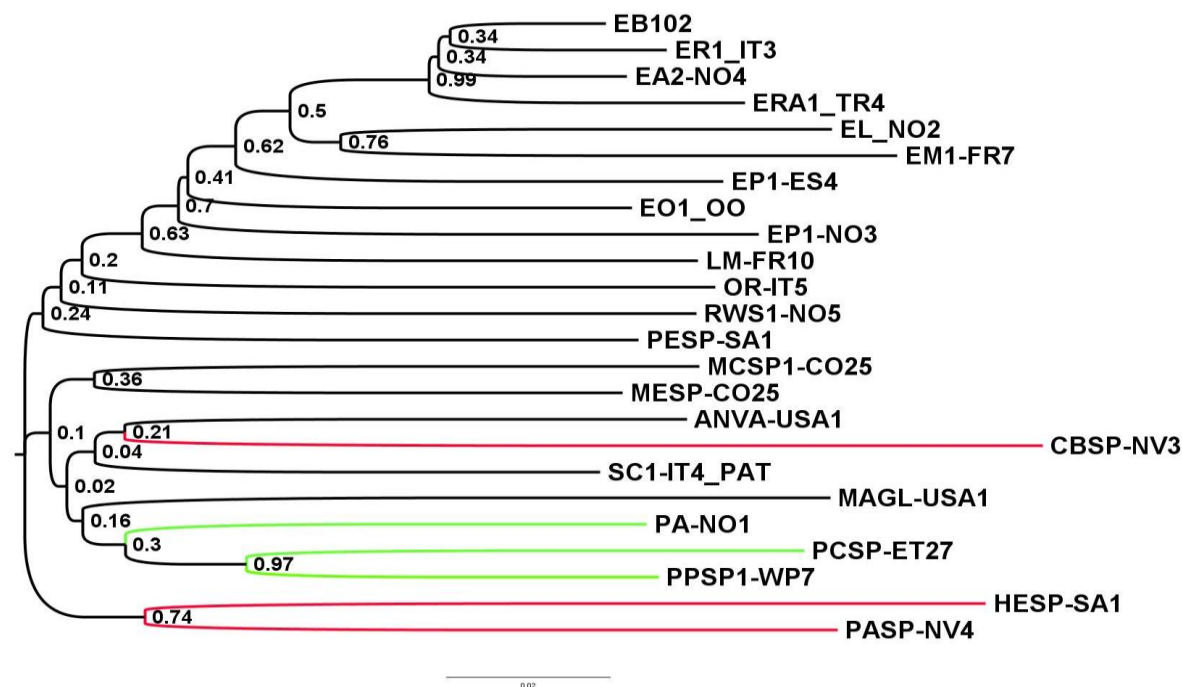
Iz dobivenih vrijednosti međusobnih udaljenosti (PD) nukleotidnih slijedova ulančanih mitohondrijskih gena izračunate su prosječne vrijednosti unutar pojedinih grupa (Tablica 21). Također su izračunati prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka ulančanih mitohondrijskih gena unutar i između grupa (Tablica 22).

Tablica 21. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka mitohondrijskih gena

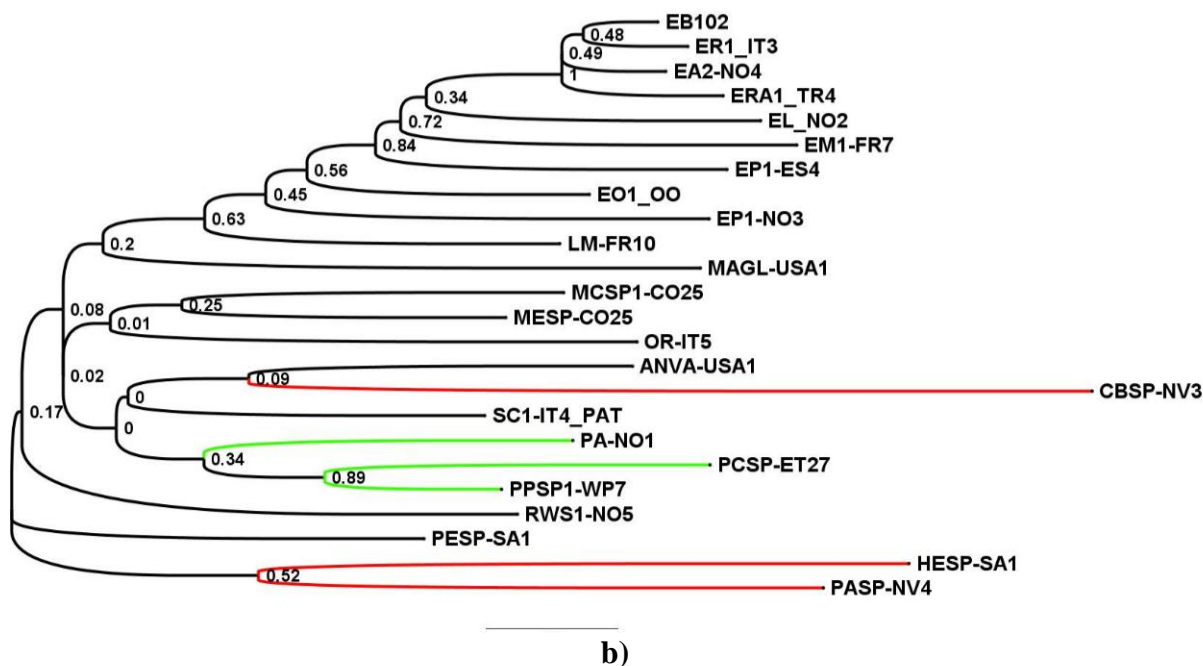
Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.15	18
Elmidae/Laraine	0.16	3
Vanjske grupe	0.19	3

Tablica 22. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka mitohondrijskih gena unutar i između grupa

	Elminae	Laraine	Vanjske grupe
Elminae	0.15		
Laraine	0.16	0.16	
Vanjske grupe	0.19	0.19	0.19



a)



Slika 41. Filogenetska stabla dobivena analizom ulančanih mitohondrijskih gena uzoraka porodice Elmidae i vanjskih grupa metodama NJ (a) ("p-distances") i ML (b) (model TN+G). Na granama su označene vrijednosti podrške za čvorove na temelju 1000 (NJ) odnosno 100 (ML) *bootstrap* ponavljanja. Crna boja označava podporodicu Elminae. Zelenom bojom je označena podporodica Larinae dok su vanjske grupe označene crvenom bojom.

Zajednička analiza mitohondrijskih gena za COI i 12S (slika 41) rezultirala je nešto višim vrijednostima podrške za pojedine grane u stablu nego pojedinačne analize ova dva gena, te svrstavanjem taksona podporodice Laraine u monofiletsku skupinu, no uz nisku podršku. Umjerena je podrška prisutna za rod *Elmis*. Međutim, podporodica Elminae je parafiletska, a taksoni vanjske skupine nisu svrstani u zajedničku grupu.

4.4.4. Srodstvene analize gena za ArgK

Iz dobivenih međusobnih udaljenosti (PD) vrijednosti nukleotidnih slijedova gena za ArgK izračunate su prosječne vrijednosti unutar pojedinih grupa za sva 3 položaja u kodonu (tablica 23) samo 1. položaj u kodonu (Tablica 24), i samo 3. položaj u kodonu (Tablica 25). Također su izračunati prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za ArgK unutar i između grupa za sva 3 položaja u kodonu. (Tablica 26)

Tablica 23. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za ArgK (sva 3 položaja u kodonu)

Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.14	14
Elmidae/Laraine	0.17	4
Vanjske grupe	0.23	2

Tablica 24. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za ArgK (samo 1. položaj u kodonu)

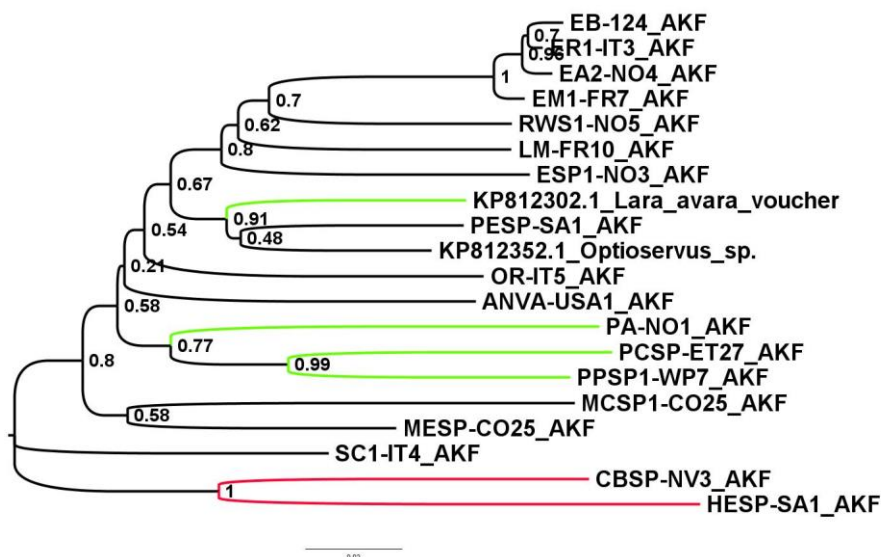
Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.06	14
Elmidae/Laraine	0.07	4
Vanjske grupe	0.10	2

Tablica 25. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za ArgK (samo 3. položaj u kodonu)

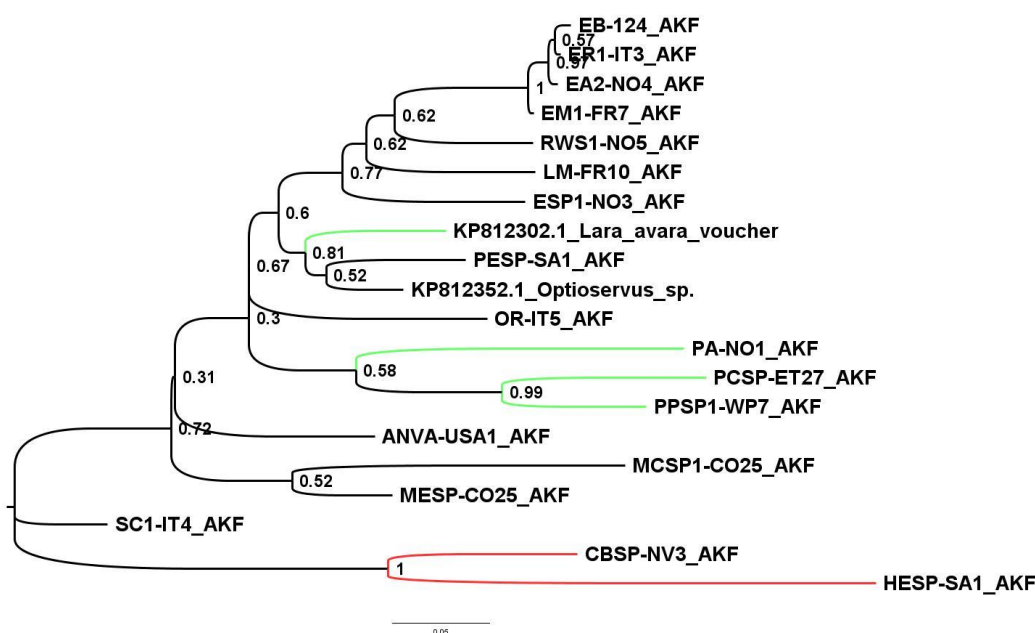
Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.34	14
Elmidae/Laraine	0.42	4
Vanjske grupe	0.55	2

Tablica 26. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za ArgK unutar i između grupa za sva 3 položaja u kodonu

	Elminae	Laraine	Vanjske grupe
Elminae	0.14		
Laraine	0.17	0.17	
Vanjske grupe	0.23	0.24	0.23



a)



b)

Slika 42. Filogenetska stabla dobivena analizom gena za ArgK (slika 42) uzoraka porodice Elmidae i vanjskih grupa te podataka iz GenBank baze podataka metodama NJ (a) ("p-distances") i ML (b; (model K2+G+I)). Na granama su označene vrijednosti podrške za čvorove na temelju 1000 (NJ) odnosno 100 (ML) *bootstrap* ponavljanja. Crna boja označava podporodicu Elminae. Zelenom bojom je označena podporodica Larainae dok su vanjske grupe označene crvenom bojom.

Filogenetska stabla dobivena analizom ArgK gena (slika 42) imaju umjerenu do visoku podršku za većinu grana. Podporodice Elminae i Larinae su parafiletske, a taksoni vanjske grupe svrstani u monofiletsku skupinu.

4.4.5. Srodstvene analize gena za CAD

Iz dobivenih međusobnih udaljenosti (PD) vrijednosti nukleotidnih slijedova gena za CAD izračunate su prosječne vrijednosti unutar pojedinih grupa za sva 3 položaja u kodonu (Tablica 27), samo 1. položaj u kodonu (Tablica 28), samo 2. položaj u kodonu (tablica 29) i samo 3. položaj u kodonu (Tablica 30). Također su izračunati prosjeci međusobne udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za CAD unutar i između grupa za sva 3 kodona (Tablica 31).

Tablica 27. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za CAD (sva 3 položaja u kodonu)

Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.19	14
Elmidae/Laraine	0.23	3
Vanjske grupe	0.26	4

Tablica 28. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za CAD (1. položaj u kodonu)

Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.07	14
Elmidae/Laraine	0.10	3
Vanjske grupe	0.15	4

Tablica 29. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za CAD (2. položaj u kodonu)

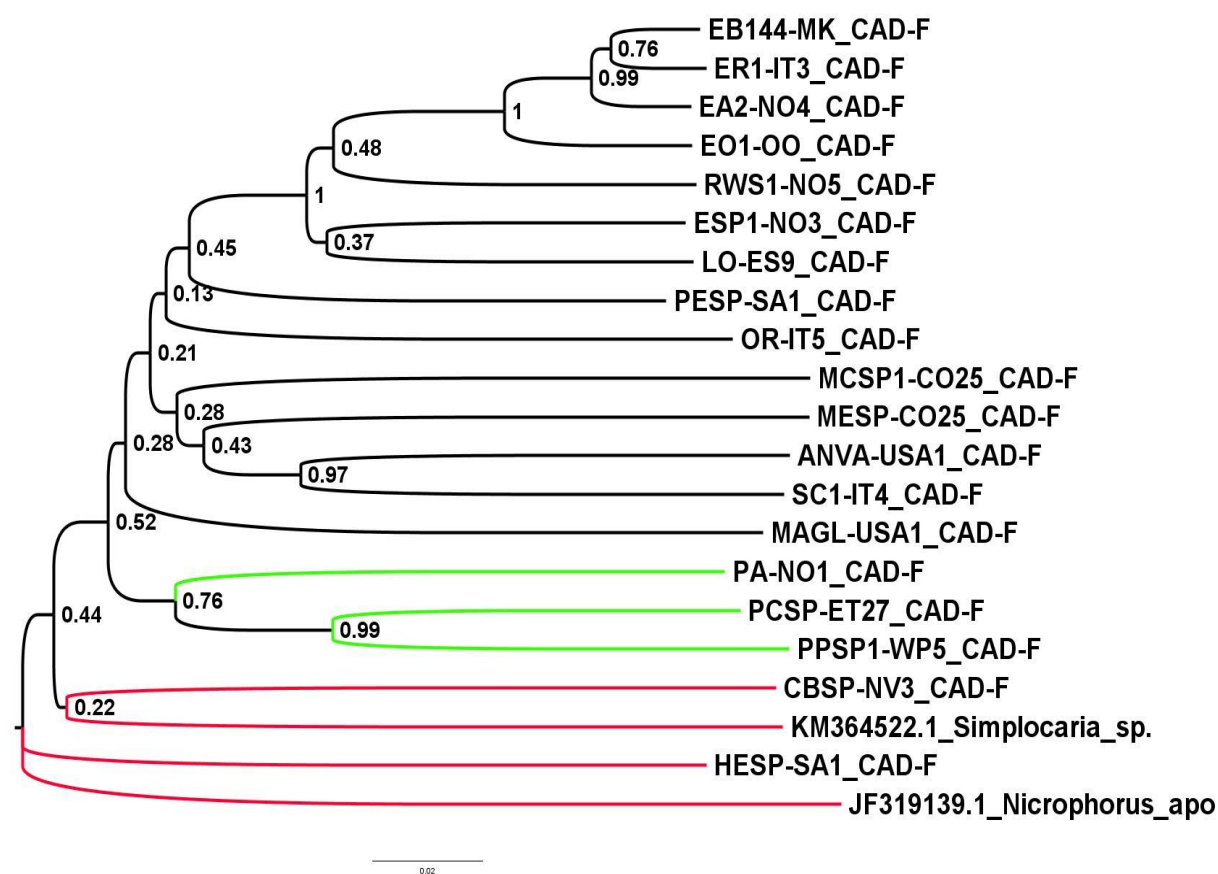
Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.04	14
Elmidae/Laraine	0.06	3
Vanjske grupe	0.07	4

Tablica 30. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za CAD (3. položaj u kodonu)

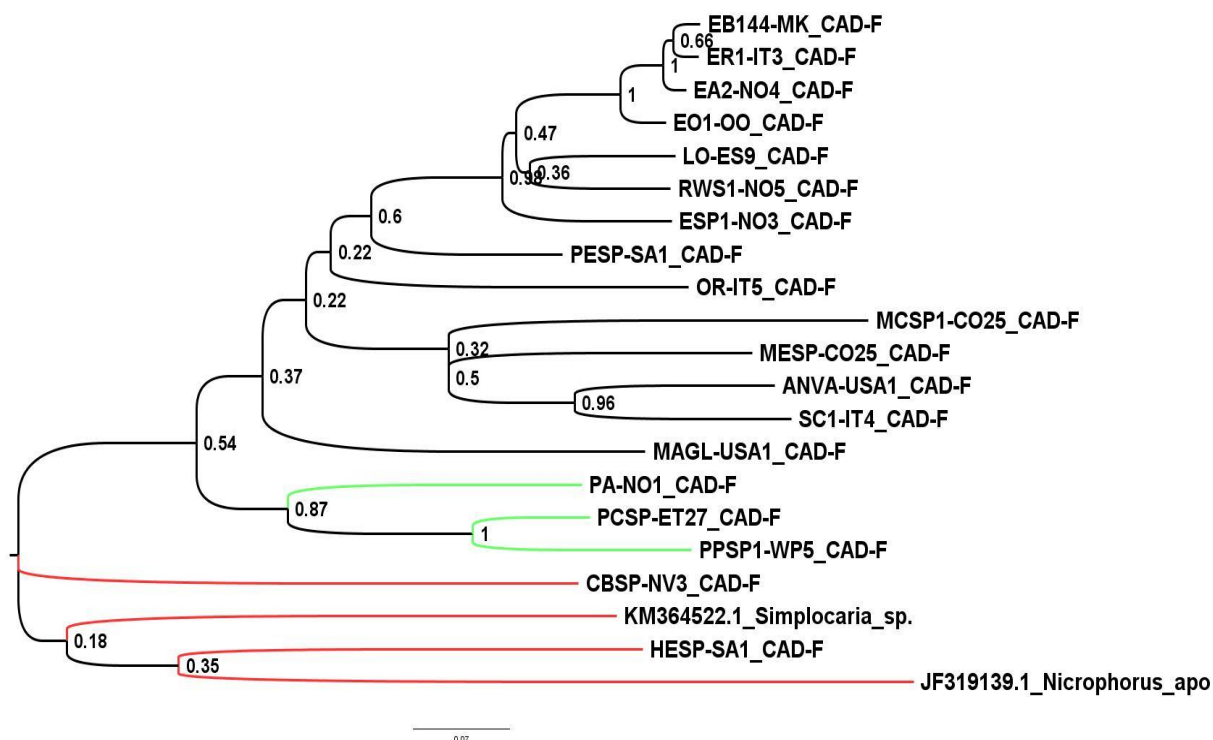
Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.05	14
Elmidae/Laraine	0.05	3
Vanjske grupe	0.06	4

Tablica 31. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za CAD unutar i između grupa za sva 3 položaja u kodonu

	Elminae	Larainae	Vanjske grupe
Elminae	0.19		
Larainae	0.23	0.23	
Vanjske grupe	0.26	0.26	0.26



a)



b)

Slika 43. Filogenetska stabla dobivena analizom gena za CAD uzoraka porodice Elmidae i vanjskih grupa te podataka iz GenBank baze podataka metodama NJ (a) ("p-distances") i ML (b) (model GTR+G+I). Na granama su označene vrijednosti podrške za čvorove na temelju 1000 (NJ) odnosno 100 (ML) bootstrap ponavljanja. Crna boja označava podporodicu Elminae. Zelenom bojom je označena podporodica Larinae dok su vanjske grupe označene crvenom bojom.

Filogenetska stabla dobivena analizom CAD gena (slika 43) imaju umjerenu do visoku podršku za većinu grana. Podporodice Elminae i Larinae su monofiletske (uz visoku podršku za Larinae i nisku podršku za Elminae), kao i taksoni vanjske skupine.

4.4.6 Srodstvene analize gena za 18S rRNA

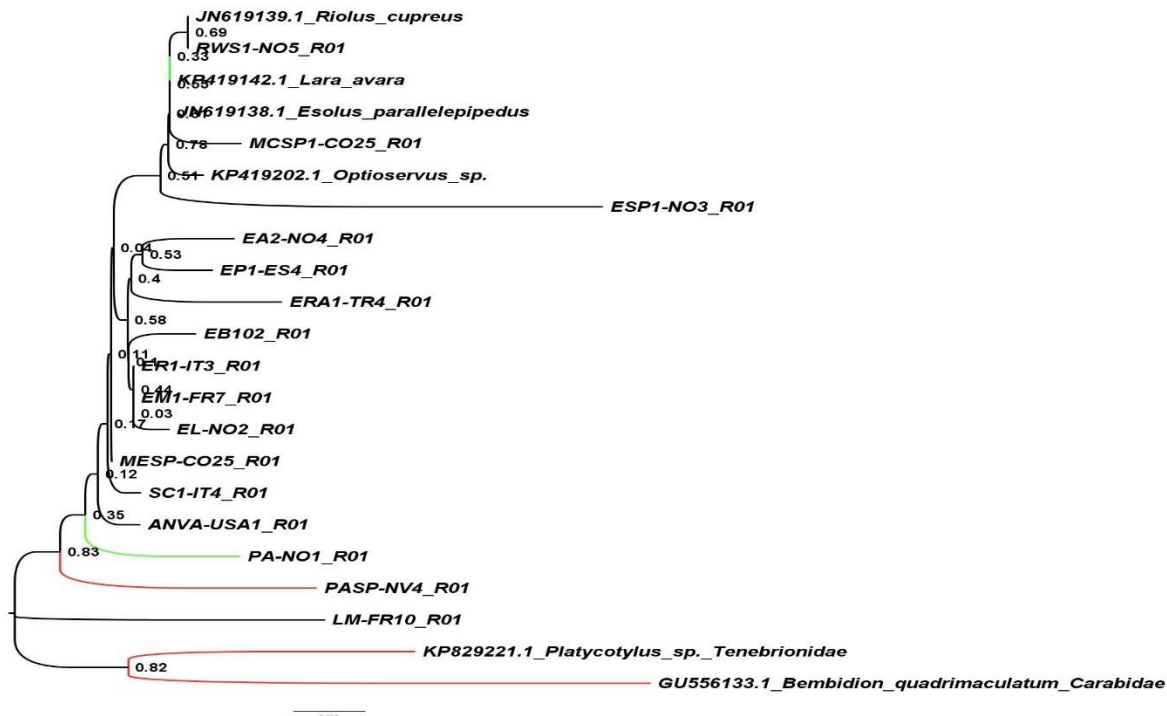
Iz dobivenih međusobnih udaljenosti (PD) vrijednosti nukleotidnih slijedova gena za 18S rRNA izračunate su prosječne vrijednosti unutar pojedinih grupa (Tablica 32) Također su izračunati prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za 18S rRNA unutar i između grupa (Tablica 33).

Tablica 32. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za 18S rRNA

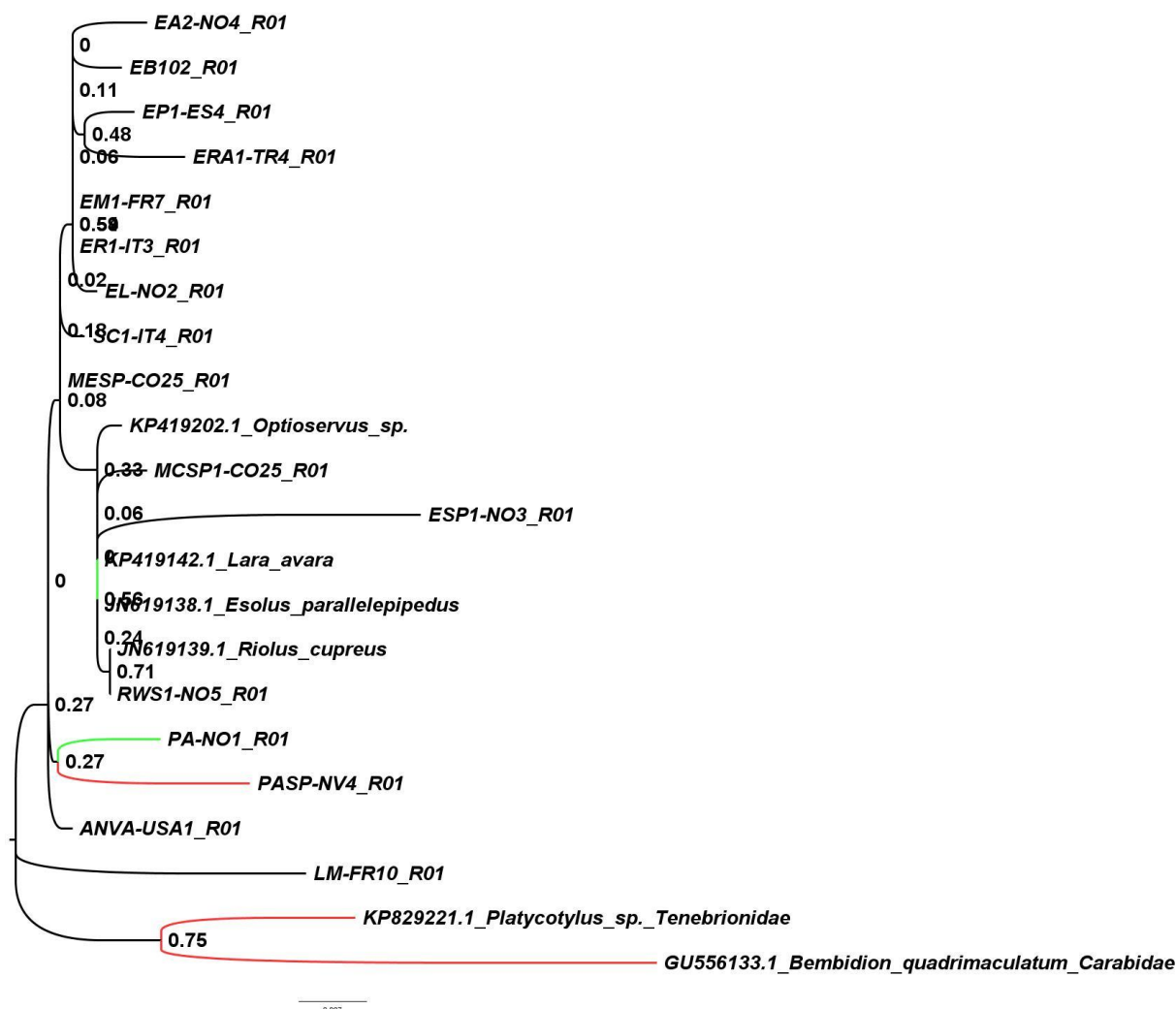
Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.01	17
Elmidae/Laraine	0.02	2
Vanjske grupe	0.05	3

Tablica 33. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza između grupa za set podataka gena 18S rRNA unutar i između grupa

	Elminae	Laraine	Vanjske grupe
Elminae	0.01		
Laraine	0.02	0.02	
Vanjske grupe	0.05	0.05	0.05



a)



b)

Slika 44. Filogenetska stabla dobivena analizom gena za 18S rRNA uzoraka porodice Elmidae i vanjskih grupa te podataka iz GenBank baze podataka metodama NJ (a) ("p-distances") i ML (b) (model T92+G+I). Na granama su označene vrijednosti podrške za čvorove na temelju 1000 (NJ) odnosno 100 (ML) *bootstrap* ponavljanja. Crna boja označava podporodicu Elminae. Zelenom bojom je označena podporodica Larainae dok su vanjske grupe označene crvenom bojom.

Većina grana u filogenetskim stablima dobivenim analizom 18S rRNA gena (slika 44) imaju izuzetno nisku podršku, ili su potpuno nerazlučena. Podporodice Elminae i Laraine, kao i taksoni vanjske grupe, su parafiletski.

4.4.7 Srodstvene analize gena za 28S rRNA

Iz dobivenih međusobnih udaljenosti (PD) vrijednosti nukleotidnih slijedova gena za 28S rRNA izračunate su prosječne vrijednosti unutar pojedinih grupa (Tablica 34). Također su izračunati prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za 28S rRNA unutar i između grupa (Tablica 35).

Tablica 34. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za 28S rRNA

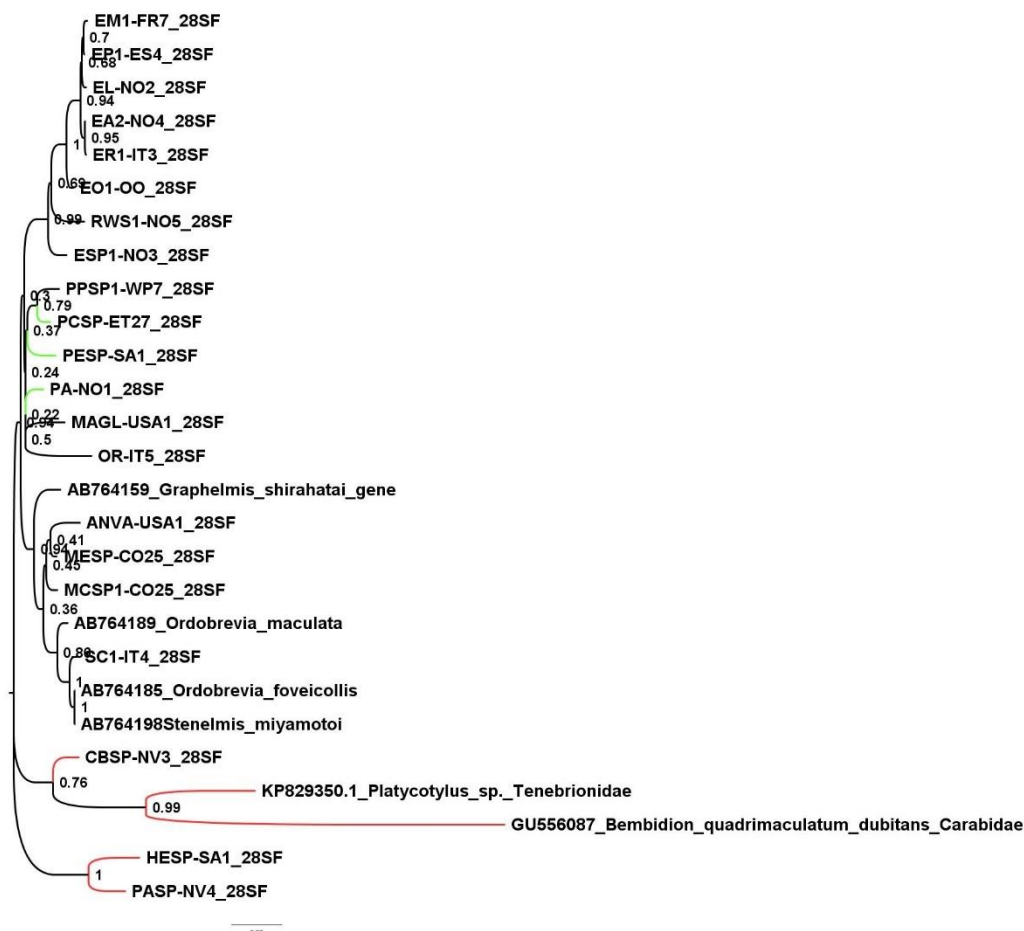
Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.07	19
Elmidae/Laraine	0.07	3
Vanjske grupe	0.17	5

Tablica 35. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena za 28S rRNA unutar i između grupa

	Elminae	Laraine	Vanjske grupe
Elminae	0.07		
Laraine	0.07	0.07	
Vanjske grupe	0.16	0.17	0.17



a)



b)

Slika 45. Filogenetska stabla dobivena analizom gena za 28S rRNA uzoraka porodice Elmidae i vanjskih grupa te podataka iz GenBank baze podataka metodama NJ (a) ("p-distances") i ML (b) (model TN+G). Na granama su označene vrijednosti podrške za čvorove na temelju 1000 (NJ) odnosno 100 (ML) *bootstrap* ponavljanja. Crna boja označava podporodicu Elminae. Zelenom bojom je označena podporodica Larainae dok su vanjske grupe označene crvenom bojom.

Analiza 28S rRNA gena (slika 45) rezultirala je filogenetskim stablima s umjerenom podrškom za većinu grana. Porodica Elmidae je monofiletska, taksoni porodice Elmidae svrstani su u tri dobro podržane skupine, a podporodice Elminae i Larainae su parafiletske.

4.4.8. Srodstvene analize ulančanih nuklearnih gena (*ArgK*, *CAD*, *18S rRNA* i *28S rRNA*)

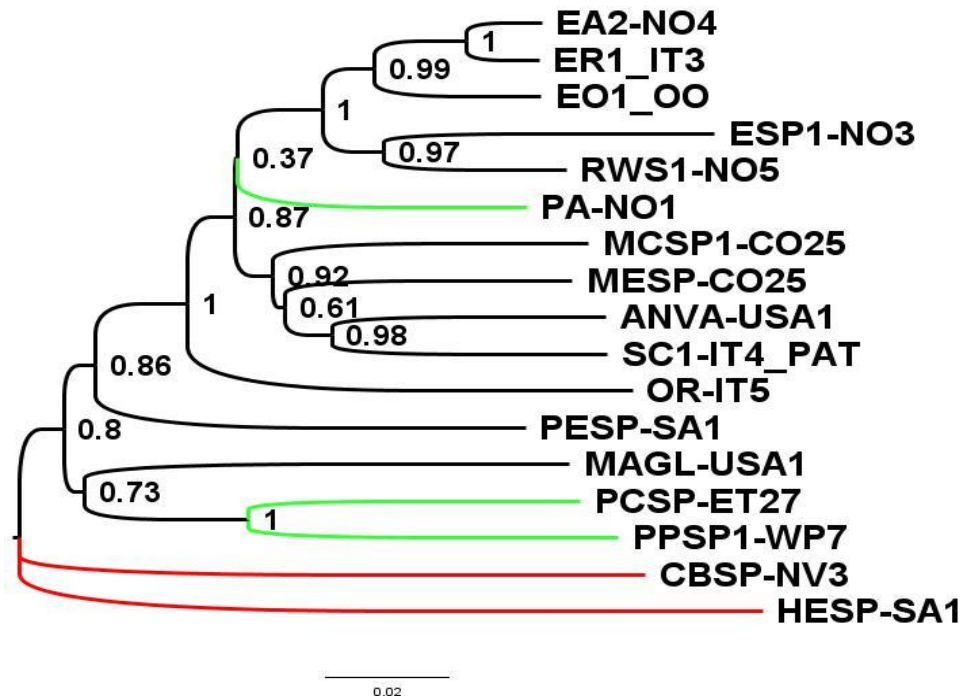
Iz dobivenih međusobnih udaljenosti (PD) vrijednosti nukleotidnih slijedova ulančanih nuklearnih gena izračunate su prosječne vrijednosti unutar pojedinih grupa (Tablica 36). Također su izračunati prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka nuklearnih gena unutar i između grupa (Tablica 37).

Tablica 36. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka nuklearnih gena

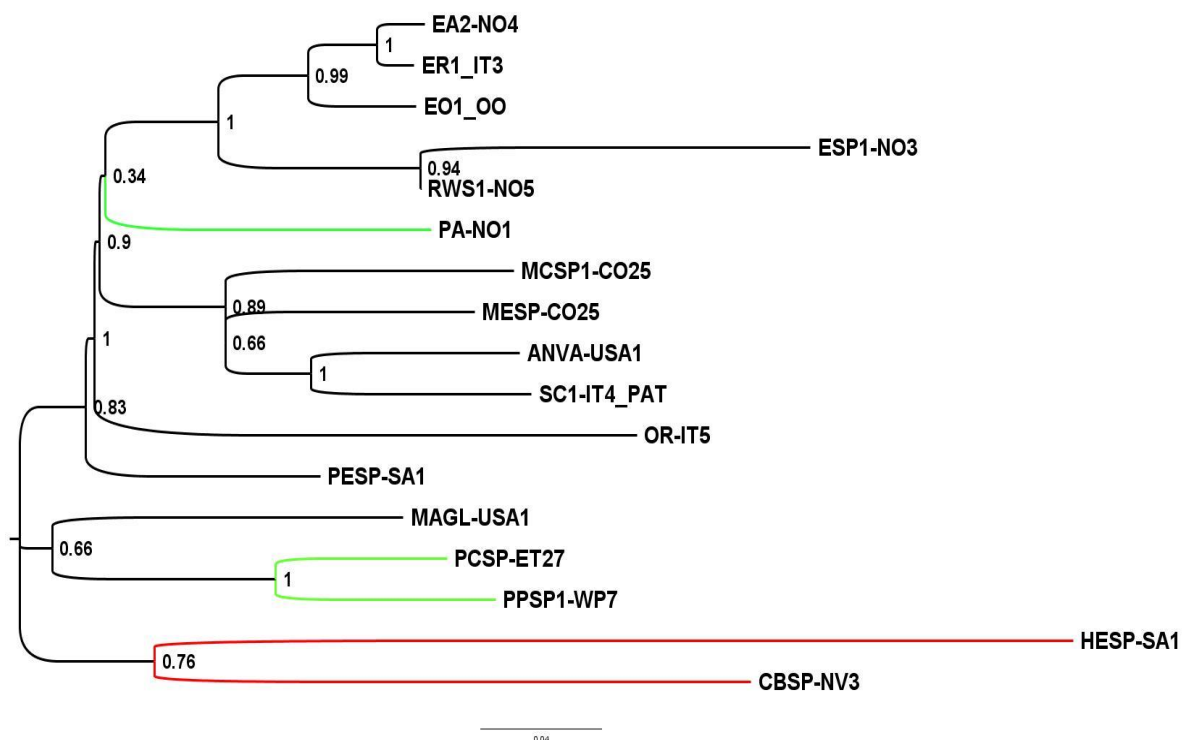
Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.12	12
Elmidae/Laraine	0.15	2
Vanjske grupe	0.21	2

Tablica 37. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza unutar i između grupa za set podataka nuklearnih gena

	Elminae	Laraine	Vanjske grupe
Elminae	0.12		
Laraine	0.15	0.14	
Vanjske grupe	0.20	0.19	0.21



a)



b)

Slika 46. Filogenetska stabla dobivena analizom ulančanih nuklearnih gena (ArgK, CAD, 18S rRNA i 28S rRNA) uzoraka porodice Elmidae i vanjskih grupa metodama NJ (a) ("p-distances") i ML (b) ML (model TN+G). Na granama su označene vrijednosti podrške za čvorove na temelju 1000 (NJ) odnosno 100 (ML) *bootstrap* ponavljanja. Crna boja označava podporodicu Elminae. Zelenom bojom je označena podporodica Larainae dok su vanjske grupe označene crvenom bojom.

Analiza ulančanih nuklearnih gena (slika 46) rezultirala je stablima umjerene do visoke podrške za većinu grana. Porodica Elmidae je monofiletska (uz visoku podršku), a podporodice Elminae i Laraine su međusobno parafiletske.

4.4.9. Srodstvene analize ulančanih protein kodirajućih gena (*ArgK*, *COI* i *CAD*)

Iz dobivenih međusobnih udaljenosti (PD) vrijednosti nukleotidnih slijedova protein kodirajućih gena izračunate su prosječne vrijednosti unutar pojedinih grupa (Tablica 38).

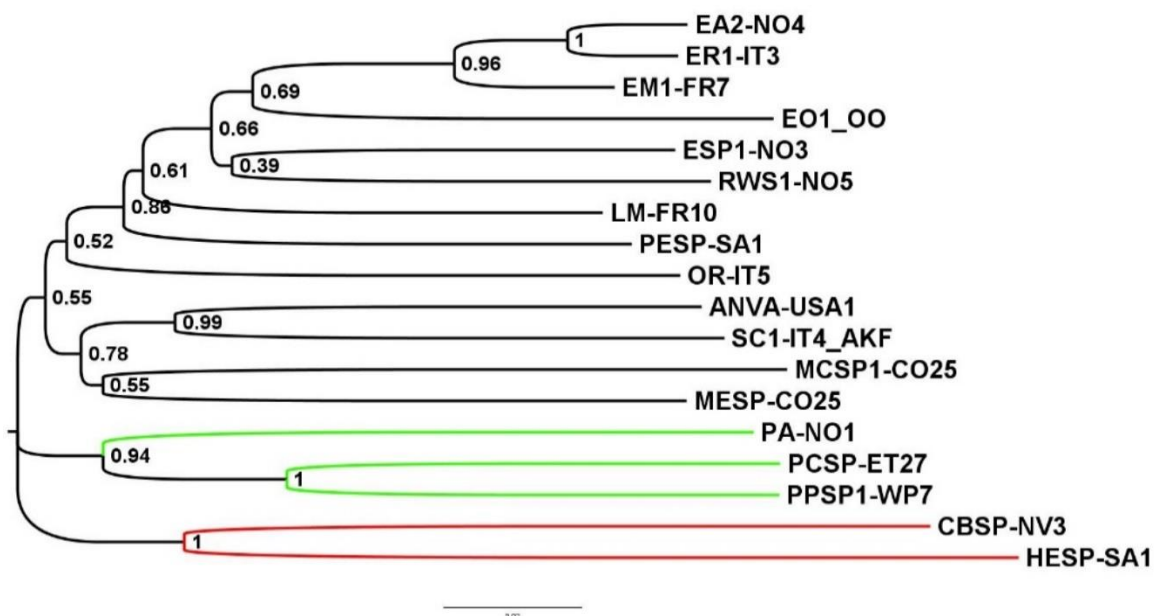
Također su izračunati prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka protein kodirajućih gena unutar i između grupa (Tablica 39).

Tablica 38. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka protein kodirajućih gena

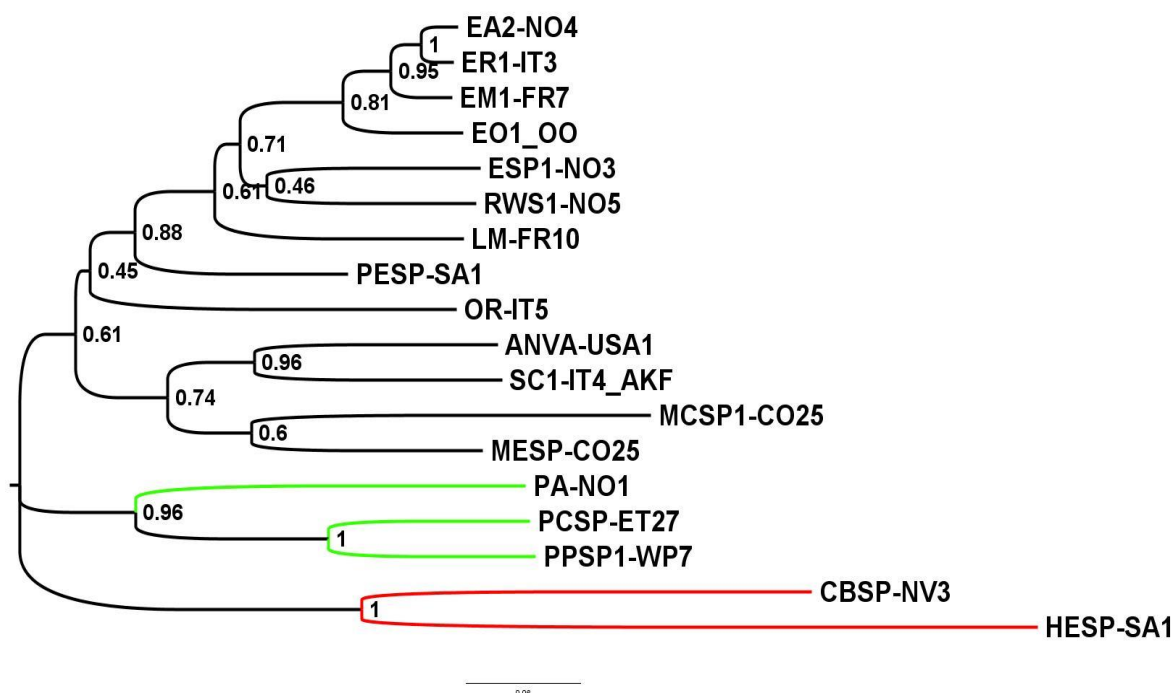
Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.17	13
Elmidae/Laraine	0.19	3
Vanjske grupe	0.23	2

Tablica 39. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza između i unutar grupa za set podataka protein kodirajućih gena

	Elminae	Laraine	Vanjske grupe
Elminae	0.17		
Laraine	0.15	0.19	
Vanjske grupe	0.20	0.21	0.23



a)



b)

Slika 47. Filogenetska stabla dobivena analizom protein kodirajućih gena (ArgK, CAD, COI) uzoraka porodice Elmidae i vanjskih grupa metodama NJ (a) ("p-distances") i ML (b) (model GTR+G+I). Na granama su označene vrijednosti podrške za čvorove na temelju 1000 (NJ) odnosno 100 (ML) *bootstrap* ponavljanja. Crna boja označava podporodicu Elminae. Zelenom bojom je označena podporodica Larainae dok su vanjske grupe označene crvenom bojom.

Analizom protein kodirajućih gena (slika 47) dobivena su dobro razlučena filogenetska stabla s umjerenom do visokom podrškom za većinu grana. Porodica Elmidae, kao i podporodice Elminae i Larainae, su monofiletske, uz visoku podršku.

4.4.10 Srodstvene analize ulančanih ribosomskih gena (12S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNA)

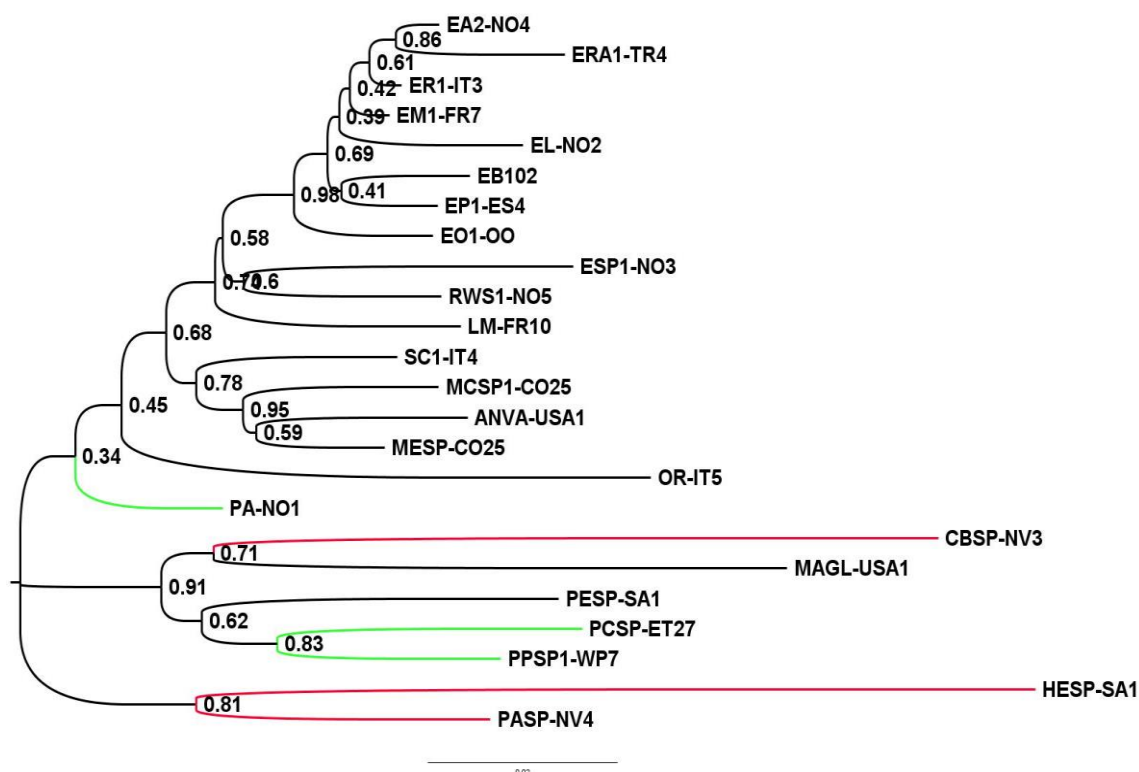
Iz dobivenih međusobnih udaljenosti (PD) vrijednosti ulančanih ribosomskih slijedova gena izračunate su prosječne vrijednosti unutar pojedinih grupa (Tablica 40). Također su izračunati prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka ribosomskih gena unutar i između grupa (Tablica 41)

Tablica 40. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka ribosomskih gena

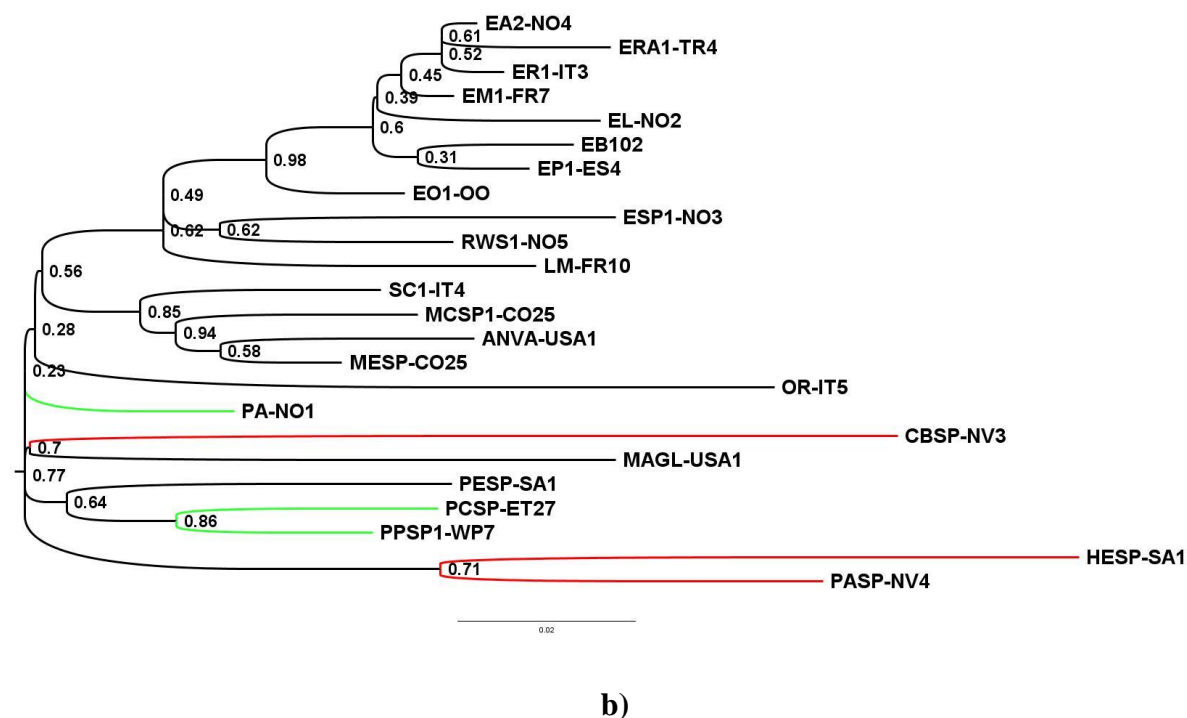
Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.09	18
Elmidae/Laraine	0.10	3
Vanjske grupe	0.11	3

Tablica 41. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza unutar i između grupa za set podataka ribosomskih gena

	Elminae	Laraine	Vanjske
Elminae	0.09		
Laraine	0.11	0.10	
Vanjske	0.15	0.12	0.11



a)



Slika 48. Filogenetska stabla dobivena analizom ulančanih gena za ribosomsku RNA uzoraka porodice Elminae i vanjskih grupa metodama NJ (a) ("p-distances") i ML (b) ML (model GTR+G). Na granama su označene vrijednosti podrške za čvorove na temelju 1000 (NJ) odnosno 100 (ML) bootstrap ponavljanja. Crna boja označava podporodicu Elminae. Zelenom bojom je označena podporodica Larainae dok su vanjske grupe označene crvenom bojom.

Analiza združenih ribosomskih gena (slika 48) rezultirala je stablima niske do umjerene podrške za većinu grana, te parafiletskom porodicom Elminae, kao i podporodicama Elminae i Larainae.

4.4.11 Analize ulančanih svih analiziranih gena

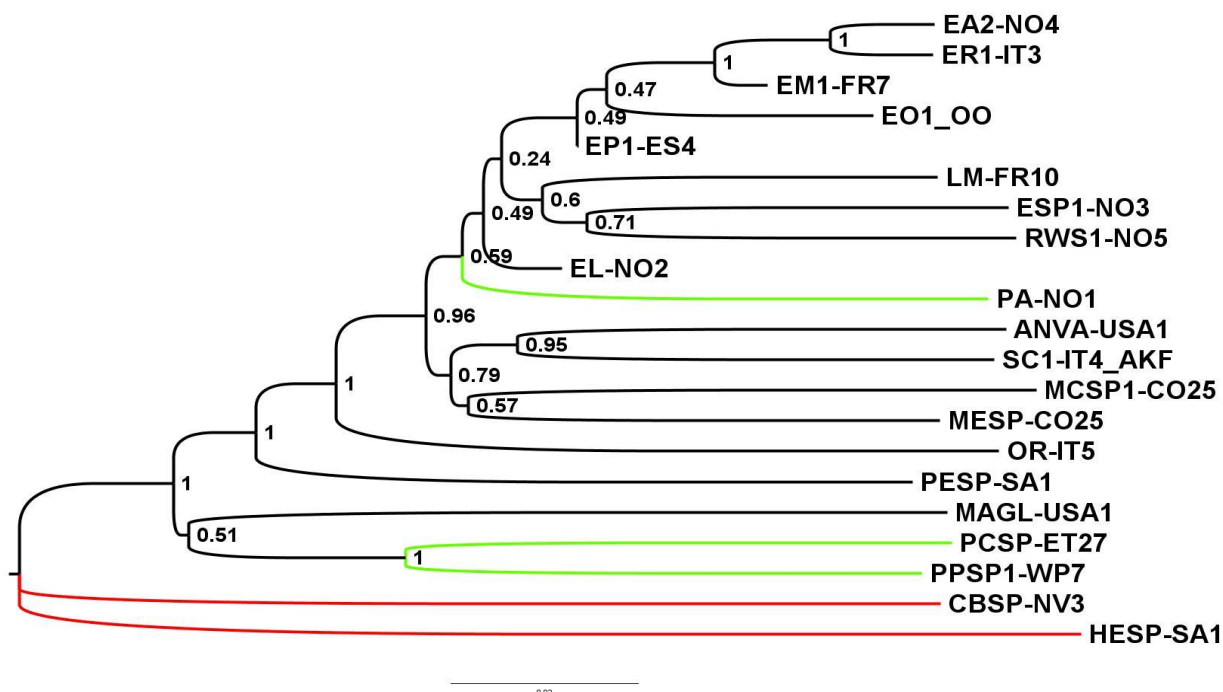
Iz dobivenih međusobnih udaljenosti (PD) vrijednosti svih združenih slijedova gena izračunate su prosječne vrijednosti unutar pojedinih grupa (Tablica 42). Također su izračunati prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka gena svih ulančanih analiziranih gena unutar i između grupa (Tablica 43).

Tablica 42. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka svih ulančanih gena

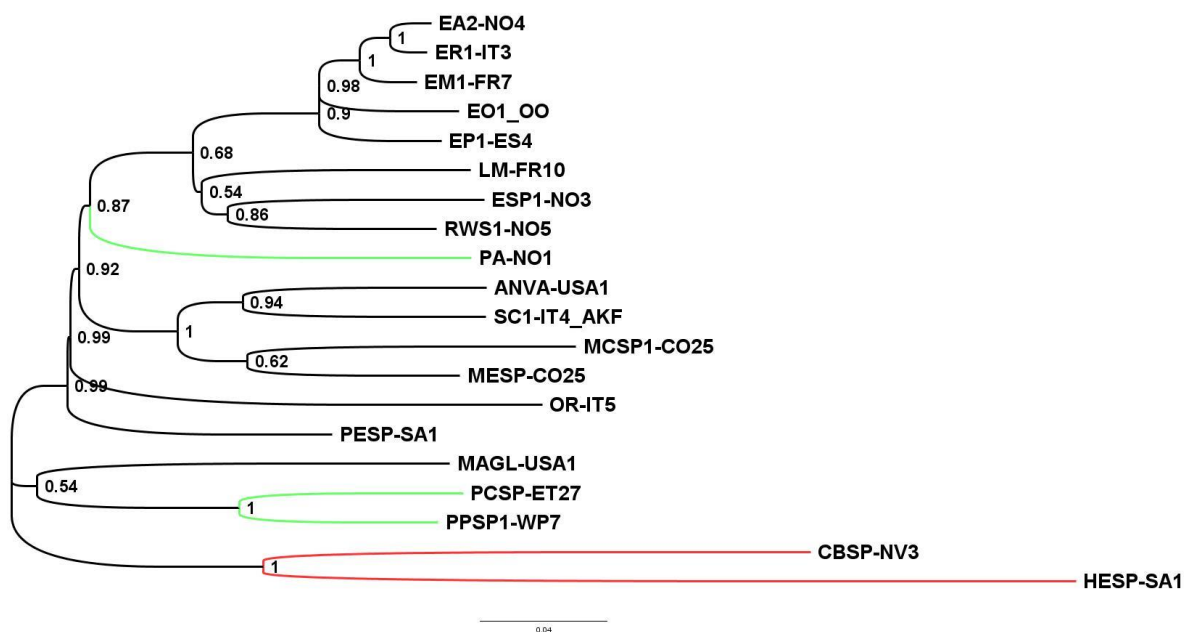
Grupa	Prosjeci unutar grupa	Broj uzoraka
Elmidae/Elminae	0.11	15
Elmidae/Laraine	0.15	3
Vanjske grupe	0.20	2

Tablica 43. Prosjeci međusobnih udaljenosti (PD) analiza za set podataka ulančanih svih analiziranih gena unutar i između grupa

	Elminae	Laraine	Vanjskae
Elminae	0.11		
Laraine	0.15	0.15	
Vanjska	0.20	0.20	0.20



a)



b)

Slika 49. Filogenetska stabla dobivena ulančanom analizom svih korištenih gena (COI, ArgK, CAD, 12S rRNA, 18S rRNA i 28S rRNA) uzoraka porodice Elmidae i vanjskih grupa NJ (a) ("p-distances") i ML (b) (model T+G+I). Na granama su označene vrijednosti podrške za čvorove na temelju 1000 (NJ) odnosno 100 (ML) *bootstrap* ponavljanja. Crna boja označava podporodicu Elminae. Zelenom bojom je označena podporodica Larainae dok su vanjske grupe označene crvenom bojom.

Filogenetska stabla dobivena analizom svih korištenih gena (slika 49) imaju umjerenu do visoku podršku za većinu grana. Porodica Elmidae je monofiletska, a podporodice Elminae i Larainae su parafiletske.

5. RASPRAVA

Iz dobivenih fotografija PCR reakcija može se vidjeti da su mitohondrijski geni uglavnom umnoženi za sve uzorke, dok su nuklearni geni bili teže amplificirani te iz pojedinih uzoraka nisu ni mogli biti umnoženi. Nuklearna DNA kod nekih uzoraka je bila djelomično (ili znatno) degradirana, dok je mitohondrijska DNA zbog većeg broja kopija i strukture znatno očuvanija te je PCR mitohondrijskih gena bio znatno efikasniji. Također se može primjetiti da je kod nekih gena došlo do nastajanja manje nespecifičnih produkata (npr. 12S rRNA, ArgK i CAD) što bi moglo upućivati na to da su njihove početnice specifičnije nego kod ostalih gena.

Dosadašnja istraživanja unutar porodice Elmidae su malobrojna te je većina radova temeljena na morfološkim istraživanjima. Dosadašnje molekularne analize obuhvaćale su uglavnom istraživanja filogenetskih odnosa vrsta unutar pojedinih rodova ili unutar pojedinih geografskih regija, uz upotrebu malog broja molekularnih markera.^{42,43,45,46} U jednom istraživanju dobiveno je stablo u kojem su podporodice Larinae i Elminae međusobno parafiletske no to istraživanje je obuhvaćalo vrlo mali broj rodova te neadekvatne markere 18S rRNA (koji je vrlo konzerviran unutar porodice) i COI (koji je izuzetno varijabilan i prezasićen supstitucijama).² Gen za citokrom oksidazu standardni je marker za barkodiranje, pa je u sklopu projekta barkodiranja faune kornjaša Njemačke analizirana 21 vrsta iz 9 europskih rodova porodice Elmidae²⁶ od kojih samo jedan pripada u podporodicu Larinae, te iz ovog istraživanja nije bilo moguće donijeti zaključke o filogenetskim odnosima unutar porodice.

Većina istraživanja su rađena za druge porodice te su korišteni razni biološki markeri i njihove kombinacije.^{25,66,67} Najčešće korišteni biološki markeri do sada su mitohondrijski geni i to najviše COI te ribosomski geni poput 12S rRNA i 16S rRNA. Iako su mitohondrijski geni dobri filogenetski markeri, istraživanja pokazuju da oni sami nisu dovoljni za detaljne analize.⁴⁹ Od nuklearnih gena najviše su korišteni geni za ribosomske RNA (18s rRNA i 28S rRNA) te u manjem broju protein kodirajući geni poput gena za ArgK, CAD, te mnogi drugi. Istraživanja i analize na pojedinim genima otkrili su da informacije dobivene njihovim korištenjem ovise o njihovim svojstvima te su neki geni bolji, a neki lošiji za različite tipove i

metode analiza. U većini istraživanja najbolje rezultate dale su ulančane analize više tipova gena.^{56,65,66} Zbog velike kompleksnosti vrsta istraživanja su pokazala potrebu za većom količinom različitih vrsta gena koji bi se koristili u analizi. Također je potrebna procjena njihove korisnosti obzirom na metode korištene u analizi. Opsežno istraživanje više različitih gena koji kodiraju proteine⁵⁰ pokazalo je da su svi korišteni geni (ArgK, CAD, topizomeraza 1, PECK, RNA polimeraza, enolaza, *wingless*) dali dobre rezultate (70 posto i više maksimalne vjerojatnosti) u kasnijim divergencijama testirane grupe (Trechitae) što pokazuje da protein kodirajući geni imaju očuvane karakteristike pri analizama na nižim stupnjevima divergencije.

U ovom istraživanju, analizom gena za COI utvrđeno je da 1. položaj u kodonu daje najbolje rezultate pri NJ i ML analizi iako su podržane slabim bootstrap vrijednostima vjerojatno zbog gore navedenih razloga (varijabilnost, zasićenost). Topologija stabla je dobro razvrstana te su vanjske skupine dobro odjeljene kod NJ metode dok je kod ML metode topologija lošija. Kod stabla dobivenog NJ metodom se može vidjeti da je većina Elminae (uz neke izuzetke) monofiletska dok su neki taksoni porodice Elmidae svrstani sa vanjskim grupama. Kod stabla dobivenog ML metodom topologija je lošija. Iz izračunatih tablica prosječnih vrijednosti može se vidjeti da su prvi i drugi položaj u kodonu bolje sačuvani od trećeg položaja. Korištenjem gena za COI u filogenetskom istraživanju porodice Evanidae⁵¹ ustanovljeno je da topologije koje su rezultat analiza nisu u potpunosti kongruentne te procjenjene filogenije individualnih gena daju krivi signal na višim razinama. Poznato je da COI evoluirao vrlo brzo te je sklon preferenciji baza (bogatsvo AT) i zasićenju.

Detaljne analize modela primarne i sekundarne strukture 12S rRNA pokazale su da je varijacija nukleotida raširena u molekuli i nije ograničena na specifične regije ili strukture. Istraživanja su pokazala da se boljim analizama i poravnanjima sekundarnih struktura može bolje prikazati hipotetski filogenetski model nego korištenjem samog poravnanja.^{54,55} Analizom 12S rRNA dijela gena dobiveno je stablo sa slabom bootstrap podrškom koje nije dobro razlučeno što upućuje na to da bi se trebalo koristiti dodatne detaljnije analize sekundarnih struktura kao što je gore navedeno. Stablo je svrstano u tri monofiletske skupine koje nemaju raspodjelu koja je očekivana tj. uzorci različitih vrsta su svrstani naizgled nasumično.

Analize ulančanih mitohondrijskih gena rezultirale su slabijom topologijom od one koja je očekivana obzirom na grupe međutim kod obje metode vanjska grupa CBSP-NV3 nije najbolje određena. Također dolazi do krivog svrstavanja nekih unutarnjih grupa među vanjske. *Bootstrap* vrijednosti kod NJ metode imaju veće vrijednosti unutar porodice Elminae i između grupa. Većina Elminae je svrstana kao monofiletska no neke Elminae su svrstane sa vanjskim gupama i Larainama. Iako nije preporučljivo kombinirati različite tipove gena (ribosomske i protein kodirajuće) zbog različitih evolucijskih pritisaka, u ovom radu je to ipak napravljeno da bi se vidjeli rezultati takvih kombinacija.

ArgK analiza je dala stablo lošije očekivane topologije sa dobrim *bootstrap* vrijednostima. Kod obje metode dolazi do lošijeg svrstavanja određenih grupa. Vanjske grupe i Larainae su dobro svrstane kao monofiletske skupa sa nekim Elminama. Analizom sva 3 položaja u kodonu dobivene su najbolje topologije i *bootstrap* podrške. Obzirom na konzerviranost gena, prijašnja istraživanja su pokazala da je ovaj gen pogodniji za filogenetske analize na nižim razinama.⁵⁰

CAD analiza rezultirala je dobrom topologijom filogenetskih stabala kod obje metode. Sve grupe su dobro podjeljene - Elmidae su dobro podjeljene u monofiletske gupe isto kao i vanjske grupe. *Bootstrap* vrijednosti su bolje kod ML metode koja ima jaku *bootstrap* podršku unutar grupa te manju podršku za vanjske grupe. Iz izračunatih PD vrijednosti kao i kod do sada analiziranih protein kodirajućih gena može se vidjeti velika razlika u odabranim položajima u kodonu za analizu. Prijašnjim analizama pronađeno je da je CAD bolji za niže razine analize te su dobiveni dobri rezultati što se može vidjeti i iz prijašnjih procjena CAD gena kao markera za filogenetske analize.⁵⁰

Analiza 18S rRNA gena pokazuje da je taj gen jako dobro očuvan⁵⁶ što se može vidjeti iz njegovih prosječnih vrijednosti međusobnih udaljenosti. *Bootstrap* vrijednosti su slabo podržane unutar grupa te topologija nije dobro razlučena. Kod 18S rRNA je također primijećeno da je potrebno detaljnije određivanje sekundarne strukture rRNA molekula u povezivanju nukleotidnih poravnanja. Analizama sekundarnih struktura otkriveno je da regije heterogenih sekvenci čiju je homologiju natježe uspostaviti sadrže vrijedne filogenetske podatke.^{57,58} Stabla dobivena analizom 18S rRNA gena u ovom radu u potpunosti su nerazlučena zbog njegove izuzetne očuvanosti koja je vidljiva i iz vrlo niskih PD vrijednosti kako unutar tako i između grupa unutar porodice Elmidae.

Analiza 28S rRNA daje dobru topologiju obzirom na vanjske gupe koje su dobro svrstane kao monofiletske dok među porodicama ta razlika nije toliko vidljiva. Stablo ima dobre vrijednosti *bootstrapa* za vanjske grupe, međutim te vrijednosti među porodicama su slabije, razlučivost je vrlo slaba što također upućuje na to da bi se detaljnijim poravnanjem sekundarne strukture RNA dobili bolji rezultati.⁵⁹

Analiza združenih nuklearnih gena daje dobru topologiju obzirom na grupe te dobru *bootstrap* podršku u obje metode. Većina uzoraka je svrstana u očekivane monofiletske grupe uz neke iznimke (MAGL-USA i PA-NO3).

Ulančane analize svih ribosomskih gena također daju lošiju topologiju obzirom na grupe te svrstavaju više različitih grupa u jednu monofiletsku granu. *Bootstrap* podrška je dobra u obje metode. Uzorak PA-NO3 nije najbolje određen kod ribosomskih i združenih analiza te je svrstan u grupu Elminae.

Iz analize protein kodirajućih gena može se vidjeti da je dobivena očekivana topologija koja dobro odjeljuje grupe te ih svrstava u očekivane monofiletske skupine, i dobro je podržana *bootstrap* vrijednostima.

Ulančana analiza svih korištenih gena rezultirala je dobrom topologijom i *bootstrap* podrškom te su grupe dobro podijeljene, međutim uzorak PA-NO3 se svrstava kao polifiletska skupina u odnosu na Larinae što je jedino odstupanje u odnosu na očekivane rezultate.

Analize ribosomskih gena i ulančanih mitohondrijskih gena COI i 12S rRNA dale su lošije topologije i slabije *bootstrap* podrške obzirom na očekivane. Najbolje očekivane topologije i *bootstrap* podrške su dobivene kombinacijom ulančanih protein kodirajućih gena, ulančanih nuklearnih gena, gena za CAD te ulančane analize svih gena.

Obzirom na dosad vršena istraživanja rezultati ovog rada dobro se uklapaju u prijašnje dobivene rezultate. Ribosomski geni su korišteni više za istraživanja bazičnih veza dok su mitohondrijski geni bolji za niže taksonomske razine.² Iako su često korišteni, signal koji je dobiven uporabom mitohondrijskih i ribosomskih gena je ograničen. Istraživanja pojedinačnih ili ukupnih mitohondrijskih gena su pokazala da oni sami ne daju dovoljno dobar filogenetski

signal.³⁸ Kod većine studija zaključeno je da su najbolji podaci dobiveni kombinacijom više gena.⁶⁰

Zbog sve većeg broja dostupnih podataka o sekvencama cjelokupnih genoma velikog broja organizama, te boljih metoda sekvenciranja i naprednih bioinformatičkih analiza, u novije vrijeme prelazi se na korištenje novih vrsta markera. Markeri su određeni iz sekvence genoma te ciljaju na mjesta koja imaju željena svojstva (konzerviranost, varijabilnost itd.). Takvi markeri pokazuju bolja svojstva za filogenetske analize obzirom na tradicionalne markere.⁶¹

6. ZAKLJUČAK

1. Upotrijebljeni molekularni markeri pokazali su različite razine (mogućnosti) razlučivanja filogenetskih odnosa unutar porodice Elmidae:

Mitohondrijski geni COI i 12S su vrlo varijabilni, te su "korisni" do razine roda i između bliskih rodova (npr. rodovi *Elmis*, *Ancyronyx*), a na nižim razinama su prezasićeni;

18S rRNA je izuzetno konzerviran i neupotrebljiv na razini porodice zbog premalog broja informativnih karaktera;

28S rRNA daje prilično dobre rezultate u odvajanju grupa unutar porodice i prilično dobru podršku;

Ulančani nuklearni, ulančani protein kodirajući geni te *ArgK* i *CAD* daju najbolje razlučivanje i podrške za topologiju;

2. Kombiniranje većeg broja markera daje bolje rezultate, osobito kombinacija ulančanih nuklearnih gena daje dobro podržanu topologiju;

3. Usporedba metoda NJ i ML pokazala je da ML daje u prosjeku bolje podržane topologije;

4. U većini analiza podporodice *Elminae* i *Larainae* su međusobno parafiletske, no obzirom na mali broj taksona (osobito podporodice *Larainae*) nije moguće donijeti konačan zaključak o njihovom međusobnom statusu;

5. Ovo pilot-istraživanje upućuje na potrebu revizije taksonomskog statusa podporodica *Larainae* i *Elminae*, no svakako je u daljnjim istraživanjima potrebno postojeci set podataka proširiti većim brojem taksona iz obje podporodice (osobito *Larainae*) a također i uravnotežiti ga s obzirom na geografsku rasprostranjenost rodova porodice *Elmidae*.

7. LITERATURNI IZVORI

1. M.A. Jäch, M. Balke, *Hydrobiologia*, **595** (2008) 419-442.
2. R. Kundrata, M. A. Jach, L. Bocak, *Zoologica Skripta*, **46** (2016) 150–164.
3. <http://www.biology-online.org/dictionary/Phylogeny> (datum pristupa 12. lipanj 2016.)
4. A. W. F. Edwards, L.L. Cavalli-Sforza, *Evolution*, **21** (1967) 550–570.
5. A. Patwardhan, S. Ray, A. Roy, J. *Phylogenet. Evol. Biol.*, **2:2** (2014)
6. [https://en.wikipedia.org/wiki/Homology_\(biology\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Homology_(biology)) (datum pristupa 12. lipanj 2016.)
7. <https://explainry.com/difference-between/homologous-analogous-structures> (datum pristupa 12. prosinac 2016.)
8. E. V. Koonin, *Annu. Rev. Genet.*, **39** (2005) 309–318.
9. S. L. Baldauf, *Trends Genet.*, **19** (2003) 345-351.
10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/NAWBIS/Modules/Phylogenetics/phylo9.html> (datum pristupa 18. srpanj 2016.)
11. https://en.wikipedia.org/wiki/Phylogenetic_tree (datum pristupa 18. lipanj 2016.)
12. T. Hodge , M. Jamie, T. V. Cope, *J. Cell Sci.* **113** (2000) 3353–3354.
13. N. Cristianini, M. Hahn *Introduction to Computational Genomics: A Case Studies Approach*. Cambridge University Press: Cambridge. (2007)
14. D. R. Wolstenholme, K. W. Jeong, *Int. Rev. Cytol.*, **141** (1992) 173-216.
15. S. D. Mandal, L. Chhakchhuak, G. Gurusubramanian, N. S. Kumar, *De gruyter open*, **2** (2014) 1-9.
16. D. X. Zhang, G.M Hewitt, *Trends in Ecology and Evolution*, **11** (1996) 247-251.
17. R. G. Harrison, *Trends in Ecology and Evolution*, **4** (1989) 6-11.
18. A. Patwardhan, G. Gaziev, A. I. Shaikhaev, *Mol. Biol.*, **44** (2010) 358–368.
19. J. Gillespie, J. S. Johnston, J. J. Cannone, *Insect Mol. Biol.*, **15** (2006) 657–686.
20. D. H. Lunt, D. Zhang, J. M. Szymura, G.M Hewitt, *Insect Mol. Biol.*, **5** (1996) 153-165.
21. T. Sukihara , H. Aoyama , E. Yamashita, *Science*, **272** (1996) 1136–1144.
22. O. Folmer, M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, R. Vrijenhoek, *Mol. Marine Biol. Biotech.*, **3** (1994) 294-299.
23. C. Simon, F. Frati , A. Beckenbach, B. Crespi, L. Hong, P. Flook, *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **87** (1994) 651-701.

24. P. D. N. Hebert, A. Cywinska, S. L. Ball, J. R. deWaard, *Proc. Roy. Soc. Biol. Sci.* **270** (2003) 313–321.
25. K.L. Bell, T. K. Philips, *J. Linn. Soc. London, Zool.*, **165** (2012) 88-108.
26. L. Hendrich, J. Moriniere, G. Haszprunar, P. D. N. Hebert, A. Hausmann, F. Kohler, M. Balke, *Mol. Ecol. Resour.*, **15** (2015) 795–818.
27. S. Anderson, A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. D. Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. H. Smith, R. Staden, I. G. Young, *Nature*, **290** (1981) 457 – 465.
28. C. R. Woese, G. E. Fox, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74** (1977) 5088–5090.
29. <https://en.wikipedia.org/wiki/MT-RNR2> (datum pristupa 14. lipanj 2017.)
30. M. S. Springer, R. W. DeBry, C. Douady, *Mol. Biol. Evol.* **18** (2001) 132-143.
31. A. Meyer, C. Todt, N. T. Mikkelsen, B. Lieb, *Evol. Biol.*, **10** (2010).
32. <http://apollo.chemistry.gatech.edu/RibosomeGallery/S%20cerevisiae/SSU/3D%20structure%20based/index.html> (datum pristupa 12. srpanj 2017.)
33. H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 4th edition, New York, W. H. Freeman (2000) 128-269.
34. I. C. Eperon, S. Anderson, D. P. Nierlich, *Nature*, **286** (1986) 460–467.
35. <http://apollo.chemistry.gatech.edu/RibosomeGallery/S%20cerevisiae/SSU/3D%20structure%20based/index.html> (datum pristupa 12. srpanj 2017.)
36. D.W. Mount, *Bioinformatics Sequence and genome analysis*, , Cold Spring Harbor, New York (2004) str.100-200.
37. https://en.wikipedia.org/wiki/Sequence_alignment (datum pristupa 18. kolovoz 2016.)
38. T. Hunt, J. Bergsten, Z. Levkanicova, A. Papadopoulou, J. St. Oliver, R. Wild, M.P. Hammond, D. Ahrens, M. Balke, S. M. Caterino, J. Gómez-Zurita, J. Ribera, G. T. Barraclough, M. Bocakova, L. Bocak, P. A. Vogler, *Science*, **318** (2007) 1913-1916.
39. L. Čorak, *Analiza filogenetskih odnosa vodenih kornjaša (Coleoptera: Polyphaga: Hydrophilidae) upotrebom mitohondrijskih biljega*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, (2012)
40. L. Jovović, *Filogenetska i filogeografska analiza populacija kornjaša *Elmis aenea* (Müller, 1806) i *E. rioloides* (Kuwert, 1890) krških tekućica*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, (2014)

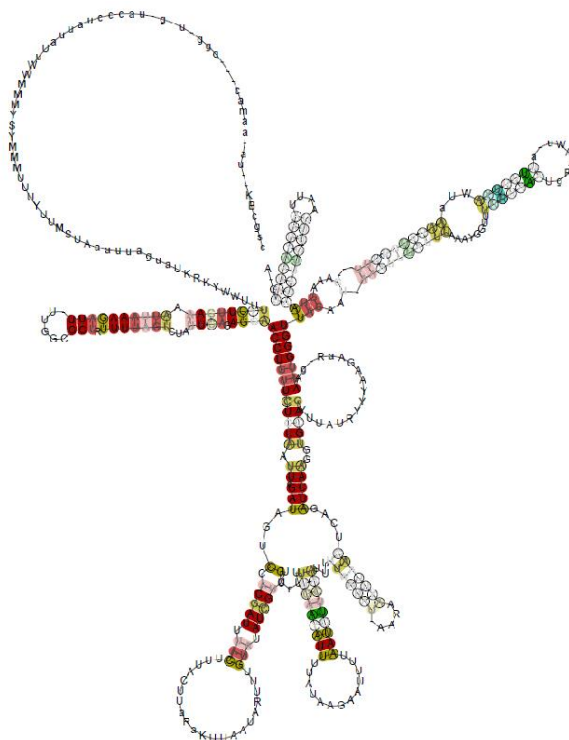
41. Brown, H.P. (2008): *Encyclopedia of Entomology* 2nd edition (u Capinera, J.L., ur.). Springer str. 3192-3193.
42. M. Hayashi, S. D. Song, T. Sota, *J. Entomol.*, **110** (2012) 689–697.
43. F. Čiampor, J. Kodada, *Zootaxa*, **2670** (2010) 59–68.
44. A. Guglielmino, M. Olmi, *Frustula Entomologica*, **24** (2001) 1-8.
45. Ž. Čiamporova-Zatovičova, F. Čiampor, J. Kodada, *Zootaxa*, **1661** (2007) 17-28.
46. F. Čiampor, I. Ribera, *Eur. J. Entomol.*, **103** (2006) 627–636.
47. H. Freitag, M. Balke, *Zookeys*, **136** (2001) 47-82.
48. H.Freitag, *Zookeys*, **321** (2013) 35-64.
49. A. A. Ptaszynka, J. Letowski, S.Gnat, W. Malek, *J. Insect Sci.* **12** (1)(2012) 16- 24
50. A. L. Wild, D. R. Maddison, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **48** (2008) 877-891.
51. A. R. Deans, J. J. Gillespie, M. J. Yoder, *Systemat. Entomol.*, **31** (2006) 517–528.
52. A. I. Cognato, A.P. Vogler, *Sistemat. Biol.*, **50** (2001) 758-780.
53. R. D. M. Page, *Nucleic Acids Res.*, **28** (2000) 3839-3845.
54. R. D. M. Page, R. Cruickshank, K. P. Johnson, *Insect Mol. Biol.*, **11** (2002) 361–369.
55. A. E. Monteros, *DNA Sequence*, **14** (2003) 241–256.
56. H. M. Hines, J. H. Hunt, T. K. O'Connor, J. J. Gillespie, S. A. Cameron, , *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** (2007) 3295-3299.
57. D. Ouvrar, B. C. Campbell, T. Bourgoïn, K.L. Chan, *Mol. Phylogenet. Evol.* **16** (2000) 403-417.
58. J. J. Gillespie, C. H. McKenna, M. J. Yoder, R. R. Gutell, J. S. Johnston, J. Kathirithamby, A. I. Cognato, *Insect Mol. Biol.*, **14** (2005) 625–643.
59. J. Gillespie, J. B. Munro, J. M. Heraty, M. J. Yoder, A. K. Owen, A. E. Carmichael, *Mol. Biol. Evol.* **22** (2005) 1593–1608.
60. L. H. Che, S. Q. Zhang, Y. Li, D. Liang, H. Pang, A. Ślipiński, P. Zhang, *Mol. Ecol. Resour.*, **13** (2017) 765–968.
61. M. Daberta, W. Witalinskib, A. Kazmierskic, Z. Olszanowskid, J. Daber. *Mol. Phylogenet.Evol.* **56** (2010) 222–241.
62. L. Gunter, Z. Levkaničova, T. H. Weir, A. S. S. L. Cameron, L. Bocak, *Mol. Phylogenet. Evol.* **79** (2014) 305-312.
63. H. Nomiyama, *Nucleic Acids Res.*, **13** (1985) 1649–658.
64. M. Bocakova, R. Constantin, L. Bocak, *Cladistics* **28** (2012) 117–129.

65. N. L. Gunter, R. G. Oberprieler, S. L. Cameron, *Austral. Entomol.*, **5** (2016) 217-233.
66. D. D. McKenna, A. L. Wild, K. Kanda, C.L Bellamy, R. G. Beutel, M. S. Caterino, C.W.. Farnum, D. C. Hawks, M. A. Ivie, M. L. Jameson, R. A. B. Leschen, A. E. Marvaldi, J. V. McHugh, A. F. Newton, J. A. Robertson, M. K. Thaer, M. F. Whiting, J. F. Lawrence, A. Slipinski, D. R. Maddison, B. D. Farrell, *Syst. Entomol.*, **40** (2015) 835-880.
67. M. Baca, E. F. A. Toussaint, K. B. Miller, A. E. Z. Short, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **107** (2016) 282-292.
68. B. G. Hall, *Phylogenetic trees made easy: a how-to manual*, Sinauer Associates, Inc Publishers Sunderland, Massachusetts (2008) 33-233.
69. J. Mallatt, C. Waggoner Craig, M. J. Yoder, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **64** (2012) 603–617.
70. M. Trizzino, M. A. Jäch , P. Audisio, I. Ribera, *Zootaxa*, **2760** (2011) 29–38.
71. B. N. Danforth, C.P. Lin, J. Fang, *Syst. Entomol.*, **30** (2005) 549–562.
72. V. Mičetić Stanković, *Vodeni kornjaši (Insecta: Coleoptera) u mikrostaništima krških izvora i tekućica*, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu (2012) 109. str.
73. M. Podnar, B. Bruvo Mađarić, W. Mayer, *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, **52** (2014) 119-129.
74. D. Posada, *Mol. Biol. Evol.*, **7** (2008) 1253-1256.
75. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree> (datum pristupa 23. travnja 2017.)
76. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html> (datum pristupa 24. travnja 2017)
77. <http://www.megasoftware.net/> (datum pristupa 28. travnja 2016.)
78. <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>(datum pristupa 29. travnja 2017.)
79. <http://rna.informatik.uni-freiburg.de/LocARNA/Input.jsp>(datum pristupa 28 travnja 2017)
80. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (datum pristupa 14. travanj 2017.)

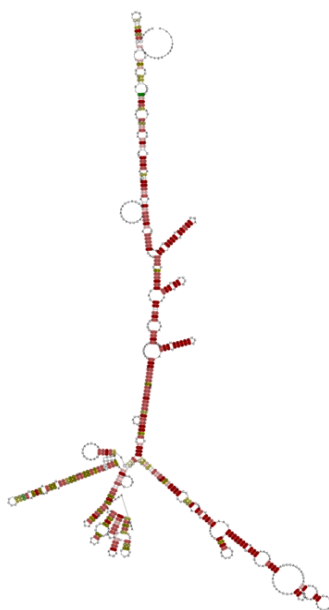
8. PRILOZI

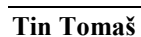
8.1 Sekundarne strukture ribosomske RNA

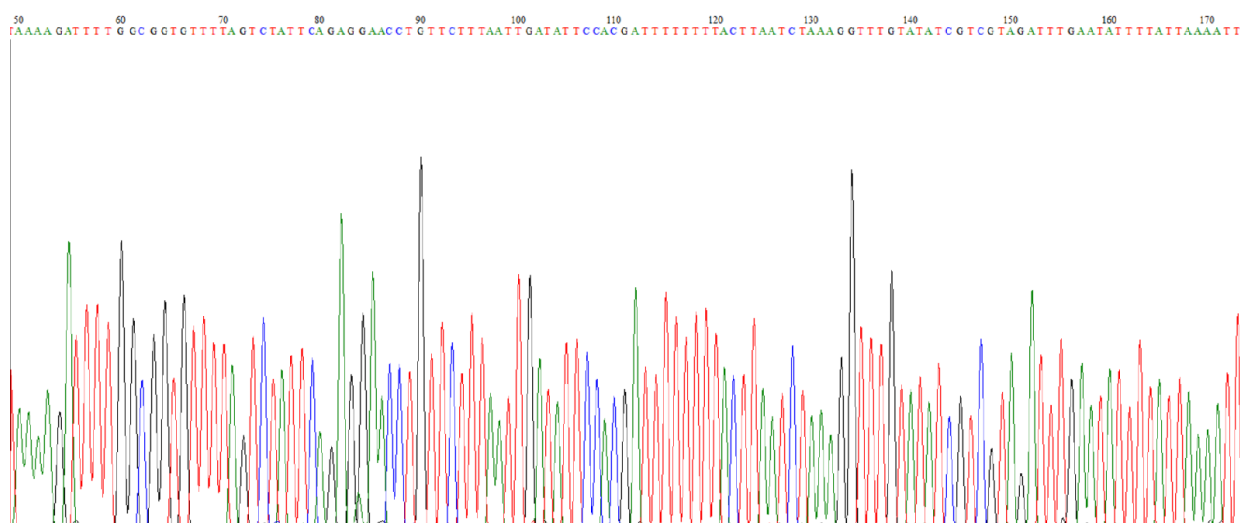
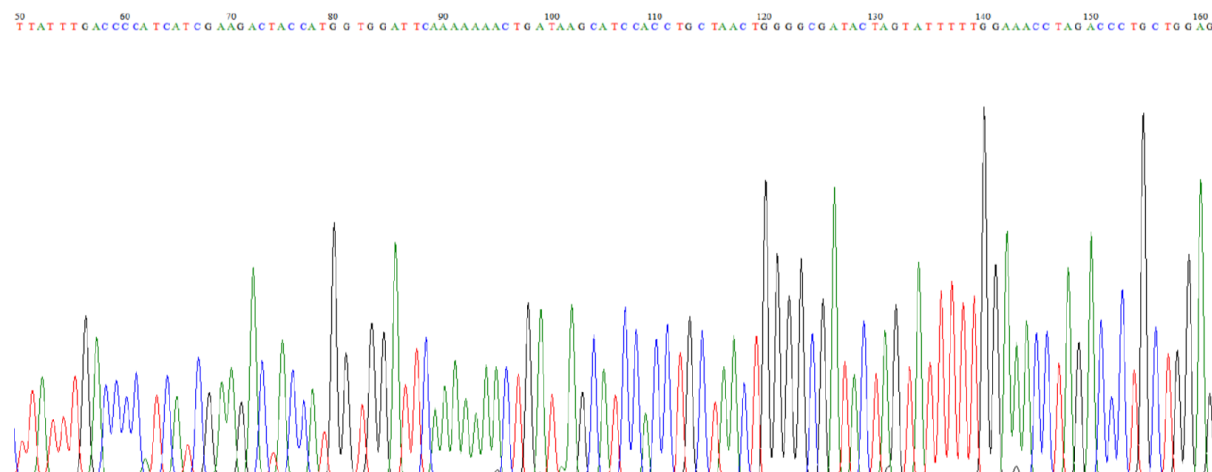
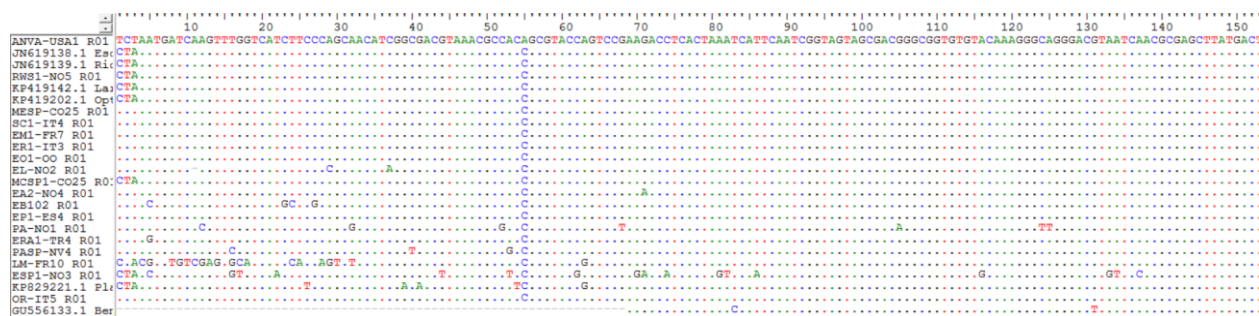
Dodatak 1. Sekundarna struktura 12S rRNA dobivena korištenjem programa LocARNA



Dodatak 2. Sekundarna struktura 18S rRNA dobivena korištenjem programa LocARNA

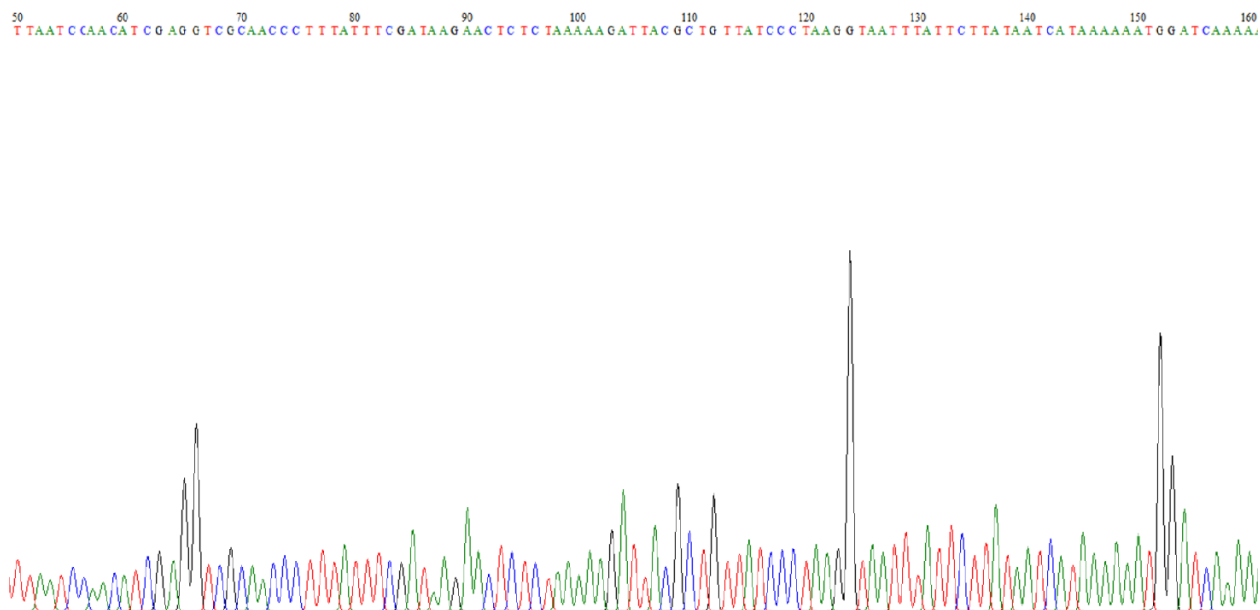




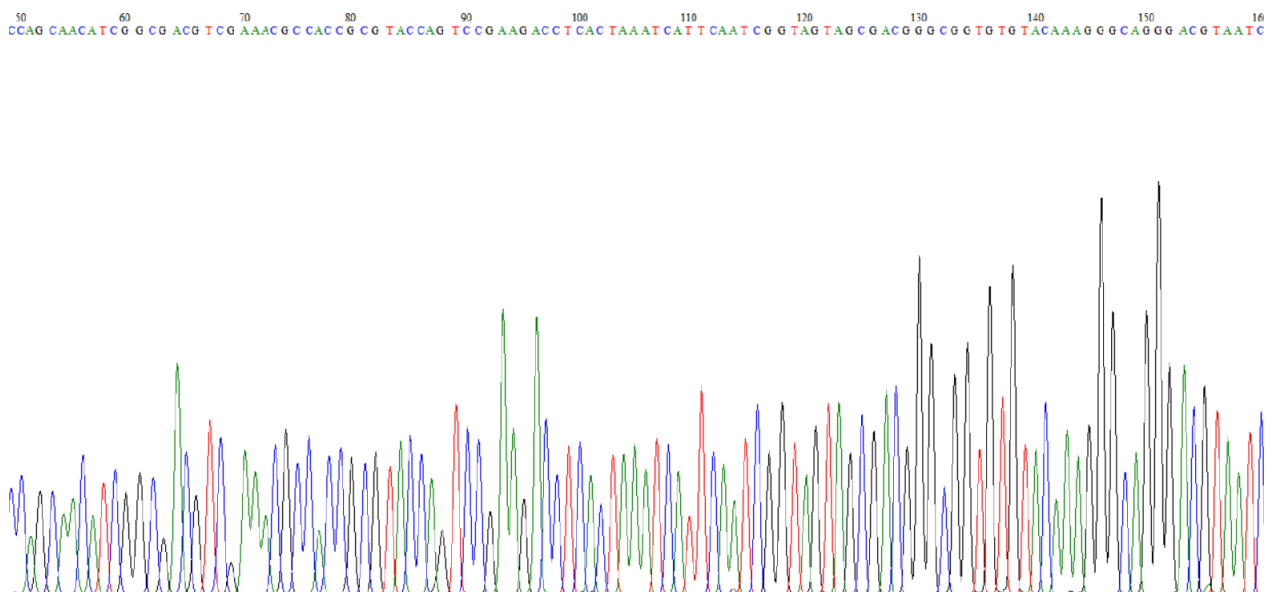


8. PRILOZI

Dodatak 12. Reprezentativni kromatogram od 50 do 160 početnih nukleotida za uzorak EA-NO2 gena za 16S rRNA

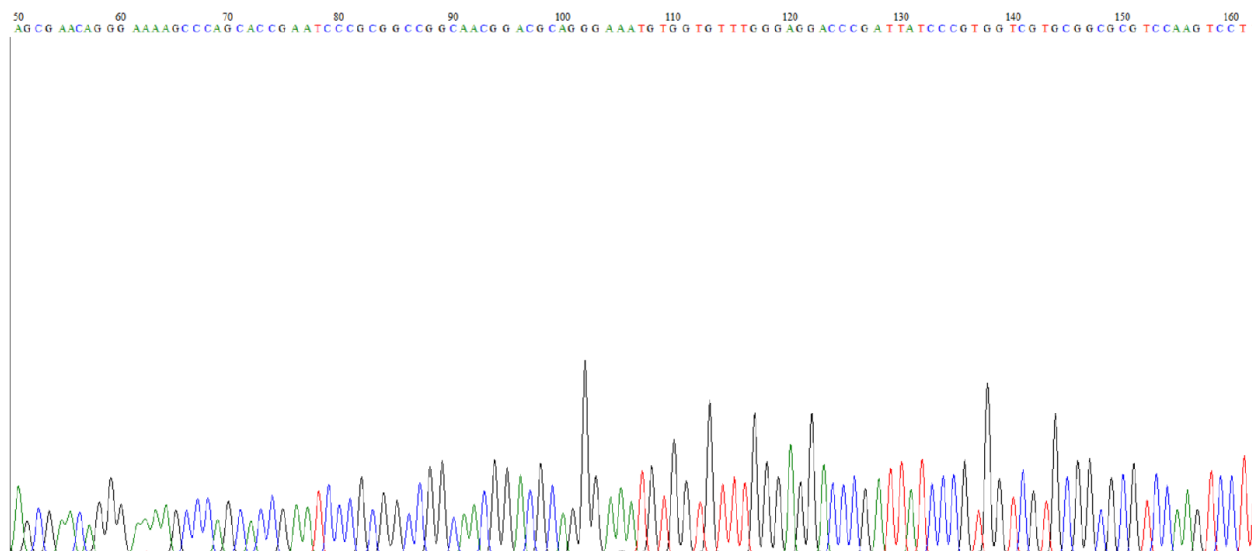


Dodatak 13. Reprezentativni kromatogram od 50 do 160 početnih nukleotida za uzorak EM-FR7 gena za 18S rRNA

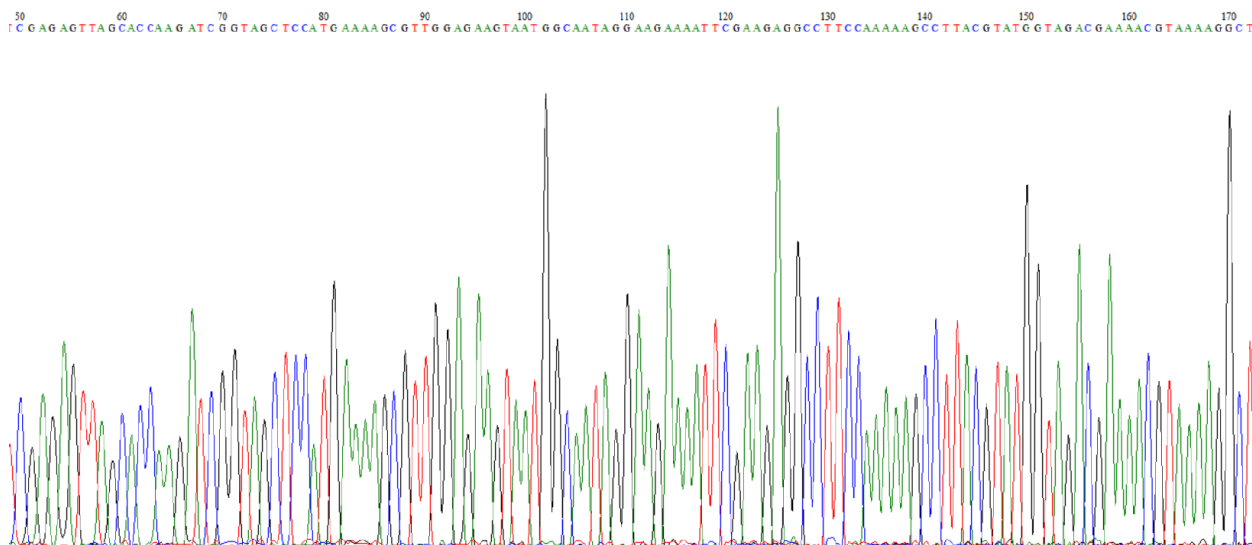


8. PRILOZI

Dodatak 14. Reprezentativni kromatogram od 50 do 160 početnih nukleotida za uzorak GEJA-CH2 gena za 28S rRNA

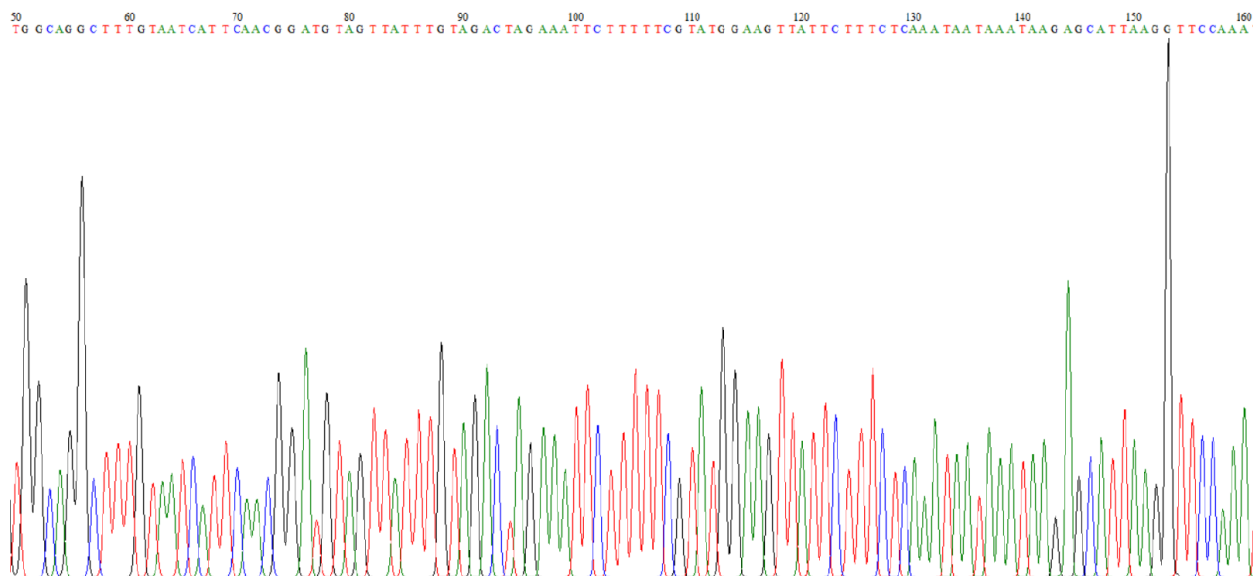


Dodatak 15. Reprezentativni kromatogram od 50 do 170 početnih nukleotida za uzorak MCSP-CO25 gena za CAD rRNA



Dodatak 16. Reprezentativni kromatogram od 50 do 160 početnih nukleotida za uzorak OR-IT5

gena za COI



9. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Tin Tomaš

Datum i mjesto rođenja: 3. svibanj 1989., Zagreb

Obrazovanje:

2014. – 2017. Sveučilišni diplomski studij kemije, Prirodoslovno – matematički fakultet, Zagreb, istraživački smjer, grane: Biokemija i Analitička kemija

2008. – 2014. Sveučilišni preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno – matematički fakultet, Zagreb

2004. – 2008. Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb